

**Erzeugung von Amylosucrase-Enzymvarianten mit neuen
katalytischen Eigenschaften unter Verwendung von neu
konstruierten Produktionsstämmen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Jens Hinnerk Schneider
aus Leer (Ostfriesland)

1. Referent:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

apl. Professor Dr. Dietmar H. Pieper

Professor a. D. Dr. Klaus Buchholz

31.01.2011

10.05.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Jens Schneider, Christin Fricke, Birgit Hofmann and Bernd Hofer (2009). „Targeting chain elongation by amylosucrase: Generation of amylosucrase variants that terminate catalysis of acceptor elongation at the di- or trisaccharide stage.“ *Applied and Environmental Microbiology* 75 (23): 7453-7460.

Jens Schneider, Christin Fricke, Heike Overwin and Bernd Hofer (2010). “High level expression of a recombinant amylosucrase gene and selected properties of the enzyme.” *Applied Microbiology and Biotechnology* (DOI 10.1007/s00253-010-3000-x).

Tagungsbeiträge

Jens Schneider and Bernd Hofer (2007). „High-level expression of a recombinant amylosucrase gene and turnover of sucrose analogues by the enzyme.“ (Poster) 32. FEBS Kongress, Wien.

Für Frauke

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....I

1. EINLEITUNG	1
1.1. Kohlenhydrate: Bedeutung und Synthesemöglichkeiten.....	1
1.2. Glucansucrasen.....	1
1.3. Amylosucrase	2
1.4. Fragestellungen und Vorüberlegungen.....	4
 2. MATERIAL UND METHODEN	 6
2.1. Chemikalien.....	6
2.2. Nährmedien und Stammlösungen.....	6
2.2.1. Nährmedien	6
2.2.1.1. Brain-Heart-Infusion-Medium	6
2.2.1.2. LB-Medium	6
2.2.1.3. LB-freeze-Medium	7
2.2.1.4. SOC-Medium	7
2.2.2. Stammlösungen	8
2.2.2.1. Antibiotika-Lösungen.....	8
2.2.2.2. 25x PBS Stammlösung (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)	8
2.2.2.3. Aufbewahrungspuffer 1 für gereinigte AS	8
2.2.2.4. Aufbewahrungspuffer 2 für gereinigte AS	9
2.2.2.5. Coomassie-Färbelösung für Proteingele.....	9
2.2.2.6. Tris-Glycinpuffer.....	9
2.2.2.7. Entfärbelösung I für Proteingele	9
2.2.2.8. Entfärbelösung II für Proteingele	10
2.2.2.9. Aufbewahrungslösung für Proteingele	10
2.2.2.10. SDS-Lösung 10 % (w/v)	10
2.2.2.11. Puffer für Polyacrylamid-Trenngel-Lösung	10
2.2.2.12. Puffer für Polyacrylamid-Sammelgel-Lösung	10
2.2.2.13. His-tag-Fixier- und Waschlösung	11
2.2.2.14. DC-Entwickler-Lösung	11
2.2.2.15. DC-Färbelösung.....	11
2.2.2.16. TAE-Puffer (50x)	11

2.2.2.17.	Gelbeladelösung für DNA-Proben	11
2.3.	Molekulargenetische Methoden	12
2.3.1.	Extraktion von Kleinmengen von DNA aus <i>Neisseria polysaccharea</i>	12
2.3.2.	Standardbedingungen für Über-Nacht-Kulturen	12
2.3.3.	Plasmid-DNA-Minipräparation	12
2.3.4.	Plasmid-DNA-Midipräparation	12
2.3.5.	Photometrische Quantifizierung von DNA	12
2.3.6.	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	12
2.3.7.	Präparative Agarose-Gelelektrophorese	13
2.3.8.	Chromatographische Aufreinigung von DNA-Fragmenten	13
2.3.9.	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	13
2.3.10.	Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren/Plasmiden.....	13
2.3.11.	A-Addition von PCR-Produkten	14
2.3.12.	Auffüllen 5'-überhängender Enden doppelsträngiger DNA	14
2.3.13.	Ligationsreaktion	15
2.3.14.	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	15
2.3.14.1.	Transformation von chemokompetenten Zellen.....	15
2.3.14.2.	Transformation von elektrokompenten Zellen	16
2.3.14.3.	Blau-Weiß-Selektion	16
2.3.15.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
2.3.16.	DNA-Sequenzierung	17
2.4.	Mikroorganismen und Plasmid-DNA.....	18
2.4.1.	<i>Neisseria polysaccharea</i>	18
2.4.2.	<i>Escherichia-coli</i> -Wirtsstämme	18
2.4.2.1.	Vektoren	18
2.4.2.2.	Konstruktion von <i>Escherichia-coli</i> -Stämmen mit dem Wildtyp-AS-Gen	19
2.4.2.3.	Konstruktion von <i>Escherichia-coli</i> -Stämmen mit einem His-tag AS-Gen.....	20
2.4.2.3.1.	Konstruktion von Plasmiden mit dem AS-Gen auf Basis des Vektors pET-33b(+)	20
2.4.2.3.2.	Konstruktion von Plasmiden mit dem AS-Gen auf Basis des Vektors pQE-81L	21
2.4.2.4.	Konstruktion von <i>Escherichia-coli</i> -Stämmen mit im Codon147 mutierten AS-Genen	21

2.4.2.5.	Erzeugung von Banken von <i>Escherichia-coli</i> -Stämmen mit statistischen Austauschen in Segmenten des AS-Gens	22
2.4.3.	Standardmäßige Kultivierung und Herstellung von Zellextrakten zur Aufreinigung von AS	26
2.4.4.	Methoden zur Zelllyse	26
2.4.4.1.	Lyse mit dem „Relay 96 Protein Screen Kit“	26
2.4.4.2.	Lyse durch French Press	26
2.4.4.3.	Lyse durch Detergenz Triton X-100	27
2.4.4.4.	Gefrier-Auftau-Lyse	27
2.4.4.5.	Lyse durch Lysozym	27
2.4.5.	Herstellung und Lagerung von AS-Variantenbanken	27
2.4.6.	Kultivierung und Zelllyse für das Hochdurchsatz-Screening der AS-Varianten- banken	28
2.4.7.	Kultivierung und Zelllyse von ausgewählten Klonen, die Polymer-defiziente AS-Variante synthetisieren	28
2.5.	Aufreinigung von His-AS-Fusionsproteinen	29
2.6.	Bestimmung der Protein-Konzentration	29
2.7.	Proteinanalyse mit denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAGE)	29
2.7.1.	Gießen und Laden der Polyacrylamid-Gele	29
2.7.2.	Probenvorbereitung und Gellauf	30
2.7.3.	Färben und Entfärben von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen	30
2.7.4.	His-tag-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen	31
2.7.5.	Dokumentation, Analyse und Lagerung von Polyacrylamid-Gelen	31
2.7.6.	Bestimmung der Reinheit aufgereinigter AS über SDS-PAGE	31
2.8.	Inkubation von Saccharose und Saccharose-Analoga mit AS	31
2.8.1.	Standardbedingungen zur Bestimmung der AS-Aktivität	31
2.8.2.	Enzymatische Konzentrationsbestimmung von Glucose und Fructose	32
2.8.3.	Enzymatische Konzentrationsbestimmung von Saccharose, Glucose und Fructose	32
2.8.4.	Test auf Umsatz von Saccharose-Analoga durch WT-AS und Varianten	32
2.8.5.	Hochdurchsatz-Screening auf Allosaccharose-Umsatz mit Banken von AS-Varianten	33
2.8.6.	Screening auf Inhibition der Amylosebildung	34
2.8.7.	Nachweis von Amylose durch Färbung mit Iod	34

2.8.8.	Aktivitätstests und Produktmuster ausgewählter Polymer-defizienter Varianten	35
2.8.8.1.	Standard-Aktivitätstests mit verschiedenen Akzeptoren.....	35
2.8.8.2.	Produktmuster mit verschiedenen Donoren und Akzeptoren.....	35
2.8.9.	Hydrolyse von Saccharose-Analoga zur Konzentrationsbestimmung	36
2.8.10.	Konzentrationsbestimmung reduzierender Zucker.....	36
2.8.11.	Dünnschichtchromatographie (DC).....	36
2.8.12.	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	36
2.8.13.	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS).....	37
2.9.	Software.....	37
3.	ERGEBNISSE	38
3.1.	Klonierung und Charakterisierung von Amylosucrase aus <i>N. polysaccharea</i>	38
3.1.1.	Klonierung verschiedener Formen des AS-Gens in verschiedene Expressionsvektoren	38
3.1.1.1.	Klonierung des Wildtyp-AS-Gens im Vektor pGEM-T Easy.....	38
3.1.1.2.	Klonierung eines His-tag-AS-Gens im Vektor pET-33b(+)-S	39
3.1.1.3.	Klonierung eines His-tag-AS-Gens im Vektor pQE-81L	41
3.1.2.	Expression der Gene und Aktivitätsnachweis der Genprodukte	42
3.1.2.1.	Nachweis der Biosynthese und Aktivität von AS <i>in vivo</i>	42
3.1.2.2.	Quantität und Kinetik der Genexpression	43
3.1.2.3.	Nachweis der AS über His-tag-Färbung	45
3.1.2.4.	Aufreinigung von 6x-His-tag-ASn.....	46
3.1.2.5.	Standard-Bedingungen der AS-Reaktion und Prinzip der Aktivitätsmessung.....	48
3.1.3.	Charakterisierung von His-tag-AS	49
3.1.3.1.	Gesamt-, Transfer- und Hydrolyse-Aktivität im Standard-Test.....	49
3.1.3.1.1.	Saccharose als einziges Substrat	49
3.1.3.1.2.	Saccharose und Glycogen als Substrate	50
3.1.3.1.3.	Effekt steigender Glycogen-Konzentrationen auf die spezifische Aktivität von AS	50
3.1.3.2.	Maltose und Maltotriose als Substrate	52
3.1.3.3.	Akzeptoren mit Glucose-Anteil im Molekül.....	53
3.1.3.3.1.	Effekt steigender Arbutin-Konzentrationen auf die spezifische Aktivität von AS	54

3.1.3.3.2.	Analyse der Produkte des Umsatzes von Saccharose mit und ohne die Akzeptoren Arbutin bzw. α -MeGl	54
3.1.3.3.3.	Akzeptor-Wirkung verschiedener Pufferkomponenten.....	57
3.1.3.4.	Umsatzversuche mit Saccharose-Analoga	59
3.1.3.4.1.	Reinheit der Saccharose-Analoga.....	59
3.1.3.4.2.	Saccharose-Analoga als Substrate	60
3.1.3.4.3.	Allosaccharose als Substrat	61
3.1.3.4.4.	Allosaccharose-Umsatz in Gegenwart von potentiellen Akzeptoren	63
3.2.	Erzeugung und Charakterisierung von gezielten Varianten der Amylosucrase...	65
3.2.1.	Vorüberlegungen	65
3.2.2.	Erzeugung und Analyse der mutierten AS-Gene	66
3.2.3.	Produktion und Aufreinigung der Proteine	67
3.2.4.	Charakterisierung der Tyr147-Varianten	67
3.2.4.1.	Spezifische Aktivität der Tyr147-Varianten im Standard-Test.....	67
3.2.4.2.	Polymerbildung	68
3.2.4.3.	Umsatzversuche mit Saccharose-Analoga	69
3.2.4.4.	Stimulierbarkeit der Aktivität der Tyr147-Varianten durch steigende Glycogen-Konzentrationen.....	69
3.3.	Erzeugung und Charakterisierung von statistischen Varianten der Amylosucrase	72
3.3.1.	Vorüberlegungen	72
3.3.2.	Erzeugung und Analyse von Banken regional mutierter AS-Gene.....	73
3.3.2.1.	Statistische Änderung der Nucleotid-Sequenz mittels degenerierter Oligonucleotide	73
3.3.3.	Screening der Banken.....	75
3.3.3.1.	Kultivierung der Varianten in MTPn	76
3.3.3.2.	Optimierung der Zelllyse für das HTS	76
3.3.3.3.	Screening auf Umsatz von Allosaccharose	78
3.3.3.4.	Screening auf Defizienz in der Kettenverlängerung	80
3.3.4.	Überprüfung der Screening-Ergebnisse ausgewählter Varianten.....	83
3.3.4.1.	Kultivierung, Lyse und AS-Konzentrierung ausgewählter Varianten	83
3.3.4.2.	Aktivitätsmessungen Polymer-negativer Varianten	83
3.3.4.2.1.	Aktivität Polymer-negativer Varianten aus Bank 5H.....	84
3.3.4.2.2.	Aktivität ausgewählter Varianten aus Bank 7/1	85

3.3.4.2.3.	Test auf <i>de-novo</i> -Polymerbildung	85
3.3.4.3.	Produktmuster mit verschiedenen Substraten	86
3.3.4.3.1.	Ausgewählte Varianten der Bank 5H	86
3.3.4.3.2.	Ausgewählte Varianten der Bank 7/1	87
3.3.4.4.	Identifizierung der Aminosäure-Austausche	89
3.3.5.	Reinigung und Charakterisierung ausgewählter Varianten	91
3.3.5.1.	Kultivierung, Lyse und Reinigung ausgewählter Varianten	91
3.3.5.2.	Standard-Aktivitätstest ausgewählter Varianten der Bank 5H mit verschiedenen Substraten	91
3.3.5.2.1.	Saccharose als einziges Substrat	92
3.3.5.2.2.	Saccharose und Glycogen als Substrate	92
3.3.5.2.3.	Akzeptoren mit Glucose-Anteil im Molekül	93
3.3.5.3.	Standard-Aktivitätstest ausgewählter Varianten der Bank 7/1 mit verschiedenen Substraten	95
3.3.5.3.1.	Saccharose als einziges Substrat	95
3.3.5.3.2.	Saccharose und Glycogen als Substrate	95
3.3.5.3.3.	Akzeptoren mit Glucose-Anteil im Molekül	96
3.3.5.4.	Produktmuster ausgewählter Varianten der Bank 5H mit verschiedenen Substraten	98
3.3.5.4.1.	Umsatz von Saccharose ohne bzw. mit Arbutin oder α -MeG1 als Akzeptor.....	98
3.3.5.4.2.	Maltose und Maltotriose als Substrate	99
3.3.5.5.	Produktmuster ausgewählter Varianten der Bank 7/1 mit verschiedenen Substraten	101
3.3.5.5.1.	Umsatz von Saccharose ohne bzw. mit Arbutin oder α -MeG1 als Akzeptor.....	101
3.3.5.5.2.	Maltose und Maltotriose als Substrate	102
3.3.6.	Modellierung der Strukturen ausgewählter Varianten	103
4.	DISKUSSION	108
4.1.	Expression und Reinigung von AS.....	108
4.2.	Charakteristika von WT-AS	109
4.3.	Charakteristika von Tyr147-Varianten	111
4.4.	Herstellung und Screening semi-statistischer Variantenbanken	113
4.4.1.	Screening auf veränderte Donor-Substratspezifität.....	113
4.4.2.	Screening auf Defizienz in der Elongation.....	114

INHALTSVERZEICHNIS

4.5.	Charakteristika von semi-statistischen Varianten	115
4.5.1.	Charakteristika von Varianten der Bank 5H	115
4.5.2.	Charakteristika der Variante V05 aus Bank 7/1	118
4.6.	Ausblick.....	118
5.	ZUSAMMENFASSUNG	120
6.	LITERATURVERZEICHNIS	122

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA(n)	Aminosäure(n)
Abs	Absorptionseinheiten
All	Allose
Allosac	Allosaccharose
α -MeG1	α -Methylglucose
AMU	Atomare Masseinheit (engl.: <i>atomic mass unit</i>)
A-Pos.	Auftragsposition im Dünnschichtchromatogramm
APS	Ammoniumpersulfat
Arb	Arbutin
AS(n)	Amylosucrase(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
Ch.	Charge
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie, -chromatogramm
dd	Doppelt destilliert
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Molarer Extinktionseffekt
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fru	Fructose
g	Erdbeschleunigung (engl.: <i>gravity</i>)
G-6-P-DH	D-Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Gal	Galactose
Galactosac	Galactosaccharose
GH	Glycosid-Hydrolase
Glc	Glucose
Glc _n	Maltooligosaccharid aus n α -1,4-verknüpften Glucose-Einheiten
GS	Glucansucrase
GTF	Glycosyltransferase
H-Brücke	Wasserstoffbrückenbindung
HK	Hexokinase
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
HTS	Hochdurchsatz-Screening (engl.: <i>high throughput screening</i>)
Hyd	Hydrolyse
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K-Zone	Konzentrierungszone im Dünnschichtchromatogramm
Leu	Leucrose
LMW	Proteinmarker für den Bereich geringer Molekulargewichte (engl.: <i>low molecular weight</i>)
Man	Mannose
Mannosac	Mannosaccharose
MCS	Polylinker (engl.: <i>multiple cloning site</i>)
MTP	Mikrotiterplatte

MW	Mittelwert
n.b.	Nicht bestimmt
NEB	Puffer zur Elution unter nicht denaturierenden Bedingungen (engl.: <i>native elution buffer</i>)
NT	Nucleotid
OBS	Oligosaccharid-Bindestelle
OD	Optische Dichte
OE	Verlängerung der Überlappung (engl.: <i>overlap extension</i>)
ORF	Offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i>)
p.a.	Zur Analyse (lat.: <i>pro analysi</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PGI	Phosphoglucose-Isomerase
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RBS	Ribosomenbindestelle
RT	Raumtemperatur
Sac	Saccharose
SAP	Alkalische Phosphatase aus Eismeergarnele (<i>Pandalus borealis</i>) (engl.: <i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SA	Standardabweichung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tra	Transfer
Tre	Trehalulose
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tur	Turanose
U	Einheit (engl.: <i>unit</i>)
ÜN	Über-Nacht
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
Vol.	Volumen
v/v	Volumen zu Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Xyl	Xylose
Xylosac	Xylosaccharose

1. EINLEITUNG

1.1. Kohlenhydrate: Bedeutung und Synthesemöglichkeiten

Kohlenhydrate (Saccharide) bilden neben den Proteinen, den Fetten und den Nucleinsäuren die vierte bedeutende Klasse biologischer Makromoleküle. Als Polysaccharide in Form von Glycogen oder Stärke dienen Kohlenhydrate beispielsweise als Energiespeicher. Als Hauptstrukturelement pflanzlicher Zellwände stellt die Cellulose die häufigste organische Verbindung auf der Erde dar. Andere biologisch wichtige Moleküle wie Proteine oder Fette werden durch Verknüpfung mit Sacchariden (Bildung von Glycokonjugaten) in ihren Eigenschaften modifiziert, wie zum Beispiel in ihrer biologischen Stabilität oder in physikalischen Eigenschaften [1,2]. Ferner fungiert die Zuckerkomponente in einer Vielzahl biologischer Abläufe als Element von Erkennungsprozessen, unter anderem bei viralen oder bakteriellen Infektionen oder bei Entzündungsreaktionen [3-6].

Auch biotechnologisch, so in der Nahrungsmittelindustrie, in der Pharmazie oder bei Kosmetika spielen die unterschiedlichsten Kohlenhydratverbindungen wichtige Rollen. Beispielsweise werden Zucker in Lebensmitteln als Präbiotika oder als nicht-kariogene oder diätetische Süßungsmittel eingesetzt [7-9]. Dextrane (α -1,6-Glucane) dienen mannigfachen Zwecken, zum Beispiel als Blutplasma-Bestandteil oder als Träger zur Verbesserung der Verteilung oder zur Verringerung der Toxizität pharmazeutischer Wirkstoffe im Körper [10]. Zucker-Aminosäuren dienen als strukturelle oder funktionelle Mimetika natürlicher Wirkstoffe [11]. Die chemische Industrie nutzt Kohlenhydrate in der Papier-, Textil-, Klebstoff- oder Baustofffertigung [12].

Aus den zahlreichen Verknüpfungsmöglichkeiten der Einzelbausteine resultiert eine immense Strukturvielfalt verschiedenster Oligosaccharide. Diese hohe strukturelle Variabilität erschwert jedoch die gezielte Herstellung komplexer Zuckerverbindungen in der synthetischen organischen Chemie. So ist eine aufwändige Schutzgruppenchemie notwendig, um unerwünschte Verknüpfungen zu vermeiden. Zudem wird meist keine hinreichende Stereoselektivität erreicht.

Enzymkatalysierte Systeme bieten in zunehmendem Maße eine Alternative zur klassischen chemischen Synthese. Enzymatische Synthesen sind in der Lage, unter milden Bedingungen und ohne Schutzgruppen mit hoher Spezifität Verknüpfungen herzustellen.

Ein Nachteil bei der Verwendung der meisten Glycosyltransferasen (GTFs) ist, dass sie nucleotid-aktivierte Zucker als Glycosyl-Donoren benötigen (so genannte Leloir-Glycosyltransferasen).

1.2. Glucansucrasen

Im Gegensatz zu Leloir-Glycosyltransferasen nutzen Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen, beispielsweise die des Typs Glucansucrase (GS), als Donor-Substrat Saccharose (Rohrzucker), ein Disaccharid aus Glucose (Glc) und Fructose (Fru). Saccharose (Sac) ist ein kostengünstiger, ausgezeichnet verfügbarer nachwachsender Rohstoff und damit ein ideales Substrat für den industriellen Einsatz. GSn sind extrazelluläre Enzyme die von Milchsäurebakterien gebildet werden. Ihre bekannte enzymatische Aktivität besteht darin, Sac (engl. *sucrose*) zu spalten und aus den resultierenden Glc-Einheiten, abhängig vom eingesetzten Enzym, Glucane verschiedener Kettenlänge und glycosidischer Verknüpfung zu bilden [13-15]. Aus dieser Eigenschaft leitet sich der Name Glucansucrase ab. Die notwendige Energie für die Reaktion stammt

aus der Spaltung der glycosidischen Bindung des Donors. Cofaktoren sind nicht erforderlich [16]. Zahlreiche GSn sind bereits beschrieben worden. Eine umfangreiche Auflistung dieser und anderer Kohlenhydrat-umsetzender Enzyme findet sich beispielsweise in der CAZy-Datenbank („Carbohydrate-Active Enzymes“, <http://www.cazy.org/>).

Aufgrund von Ähnlichkeiten ihrer Primärstrukturen wurden diese Enzyme in diverse Familien eingeteilt [17-19]. Danach zählen die GSn zur Superfamilie (Clan) H der Glycosid-Hydrolasen (GH), die aus den Familien GH13, -70 und -77 besteht.

Zur Familie GH70 gehören GTF (Glucan- und Levansucrasen) aus *Lactobacillus*, *Leuconostoc* und *Streptococcus*. Familie GH77 wird gebildet aus Amylomaltasen und 4- α -Glucanotransferasen aus diversen Bakterien. Familie GH13, die größte der GH-Familien, vereinigt eine Reihe unterschiedlicher Enzymaktivitäten und Substratspezifitäten, die auf α -glycosidische Bindungen wirken. Amylosucrase (AS) besitzt als einziges Mitglied von Familie GH13 eine Polymerase-Aktivität [20]. Alle anderen Glucansucrasen finden sich in der Familie GH70 und weisen deutliche strukturelle Unterschiede zur AS auf (siehe unten) [21]. AS ist die einzige GS, von der bereits eine räumliche Struktur bekannt ist [22].

Als strukturelles Grundelement ist wahrscheinlich allen Enzymen der Superfamilie H die katalytische Kerndomäne mit dem $(\beta/\alpha)_8$ -barrel-Motiv gemeinsam. Bei den GSn der Familie GH70 liegt dieses relativ zum barrel in Familie GH13 anscheinend zirkulär permutiert vor [23,24]. N-terminal weisen GSn ein kurzes Signalpeptid zur Sekretion auf.

Trotz der großen Übereinstimmung der katalysierten Reaktion unterscheidet sich die Struktur der AS in einigen Punkten deutlich von denen der übrigen GSn. Die Polypeptidkette von AS weist eine Länge von etwa 640 Aminosäuren (AAn) auf mit einer molekularen Masse von ca. 70 kDa auf [25]. Im Gegensatz dazu besitzen die übrigen GSn eine Masse von durchschnittlich ca. 160 kDa [26]. Bei letzteren folgt dem Signalpeptid eine variable Region unbekannter Funktion, am C-Terminus befindet sich zudem eine Glucan-bindende Domäne [27].

1.3. Amylosucrase

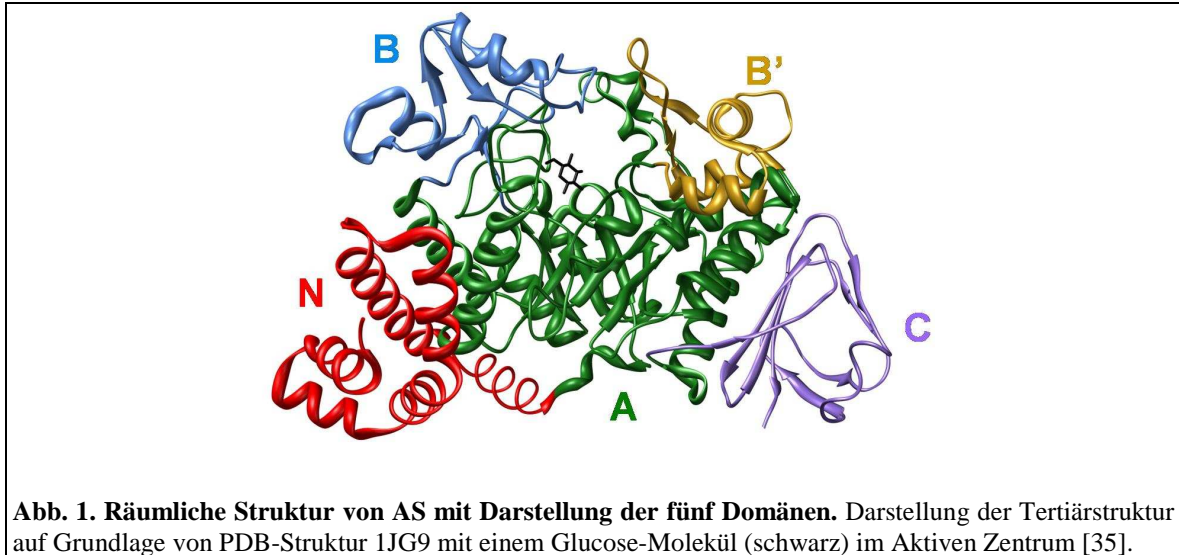
Erstmals wurde AS (systematischer Name: Sucrose:1,4- α -D-glucan-4- α -D-glucosyltransferase) 1946 von Hehre und Hamilton beschrieben [28]. Sie entdeckten, dass bestimmte Bakterien der Gattung *Neisseria* aus dem Rachen gesunder junger Erwachsener die Fähigkeit besaßen, aus Sac ein Amylose-ähnliches Polysaccharid zu bilden [29]. Aufgrund dieser Eigenschaften gaben sie dem Enzym den Namen „Amylosucrase“ (griech.: *amylon* = Stärkemehl) [28].

Ein AS-Gen wurde erstmals 1997 von Büttcher *et al.* [30] und wenig später von Potocki de Montalk *et al.* [25] kloniert. In beiden Fällen diente *Neisseria polysaccharea* (ATCC 43768) als Quelle des Gens. Zwischen beiden Sequenzen fanden sich signifikante Abweichungen. Weitere inzwischen vorliegende Sequenzen und Kristallstrukturen beweisen die Richtigkeit der letztgenannten.

Bislang sind nur drei ASn näher charakterisiert worden. Die weitaus am besten untersuchte AS ist das bereits erwähnte Enzym aus *N. polysaccharea* [25,30]. Dieses Bakterium wurde aus dem Rachen gesunder Kinder isoliert [31]. Die anderen beiden ASn stammen aus *Deinococcus radiodurans* [32] bzw. *D. geothermalis* [33]. Ihre Gene wurden über Vergleiche mit der bekannten Sequenz von AS aus *N. polysaccharea* [34] identifiziert.

Die räumliche Struktur des Enzyms aus *N. polysaccharea* wurde mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt [22]. Sie zeigt fünf Domänen (siehe Abb. 1), von denen drei auch bei den α -Amylasen der GH Familie 13 gefunden werden: Die bereits erwähnte katalytische Kerndomäne (A), sowie die Domäne B zwischen β -Strang 3 und α -Helix 3

und die C-terminale *Greek key*-Domäne [22]. Dazu kommen zwei zusätzliche AS-spezifische Domänen. Eine N-terminale α -helikale Domäne und die B'-Domäne, eine Schleife zwischen β -Strang 7 und α -Helix 7 [35]. Die N-terminale Domäne zeigt keine Verwandtschaft mit bekannten Proteinstrukturen. Ihre Funktion ist unklar. Für die B'-Domäne wird vermutet, dass sie für die Polymerisationsreaktion mit verantwortlich ist [20].



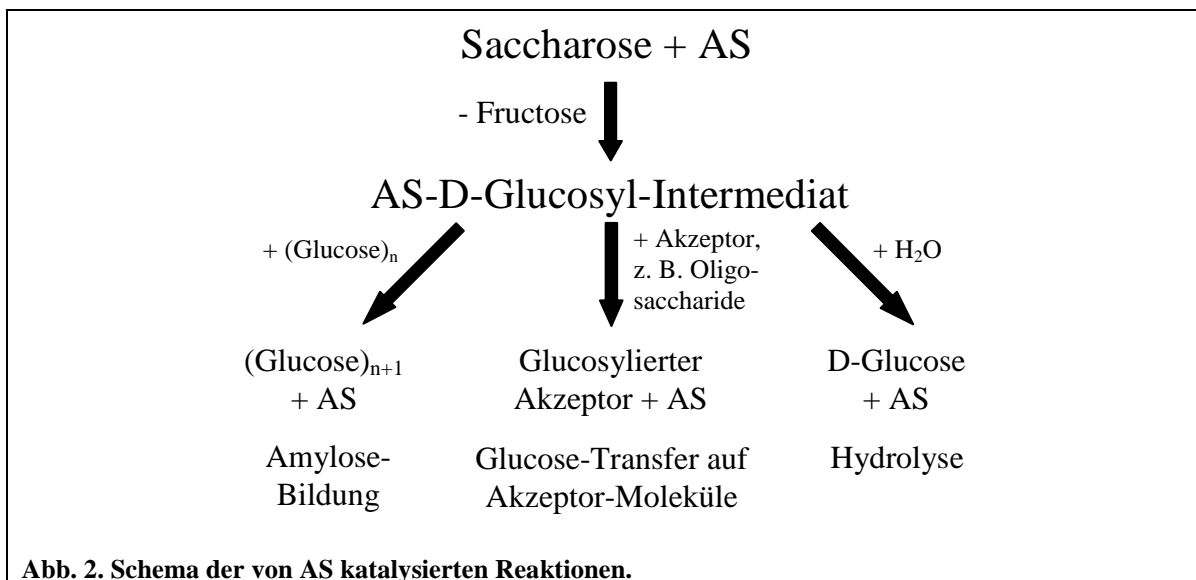
Kristallstrukturen mit gebundenen Substraten trugen viel zur Identifizierung von den an der Substratbindung und Katalyse beteiligten AAn bei [35-37]. Das Vorliegen der Strukturen war ein entscheidender Grund, weshalb das Enzym für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurde.

Die katalysierte Reaktion folgt einem so genannten *Double-Displacement*-Mechanismus über ein Enzym-Glc-Intermediat [35,38,39]. Der erste Schritt ist ein nucleophiler Angriff der Carboxylgruppe des Asp286 (Nucleophil) (hier und im folgenden wird die AA-Nummerierung der Röntgenstruktur verwendet) auf das α -glycosidisch verknüpfte C-Atom des Glc-Restes von Sac, unterstützt durch eine Protonierung des Sauerstoffs in der glycosidischen Bindung (O1) durch Glu328 (Säure/Base) [35]. Dies führt zur Bildung des Enzym-Glc-Intermediats (in β -Konfiguration) und zur Freisetzung von Fru (Abb. 2). Anschließend kann das C1 des Glc-Restes aus der α -Richtung durch eine Hydroxylgruppe eines Akzeptors nucleophil angegriffen werden. Da die ursprüngliche α -Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom des Glc-Rings im Verlauf der Reaktion wiederhergestellt wird, zählt AS zu den so genannten *retaining* GTF (engl.: *retain* = beibehalten).

Da Sac nicht als Akzeptor fungiert, kann dies in Abwesenheit weiterer Akzeptoren zunächst nur Wasser sein (Abb. 2). In späteren Reaktionszyklen stehen auch die Produkte der Hydrolysereaktion (Glc und Fru) bzw. die wachsende Glc-Kette als Akzeptoren zur Verfügung (Abb. 2). Beim Transfer auf Glc-Reste werden stets α -1,4-Verknüpfungen gebildet, d. h. es entstehen Maltooligosaccharide. Auch andere Moleküle, meist Zucker, können als Akzeptoren dienen [40]. Die Übertragung auf die freigesetzte Fru führt außer zur Rückbildung von Sac auch zur Bildung von zwei Sac-Isomeren [41], welche jedoch nicht weiter verlängert werden.

Abgesehen von Sac nutzt AS auch α -1,4-verknüpfte Maltooligosaccharide als Donor-Substrate [42]. Während Moleküle mit zwei bis vier Glc-Einheiten weniger gute Donor-Substrate darstellen, sind länger-kettige Maltooligosaccharide sogar bessere Glycosyl-Donoren als Sac. AS spaltet spezifisch die α -1,4-Bindung am nicht-reduzierenden Ende

des Donor-Substrats, bildet das AS-Glc-Intermediat und überträgt den Glc-Rest auf ein nicht-reduzierendes Ende eines Akzeptors. Derartige Disproportionierungsreaktionen wurden auch für andere Glucansucrasen beschrieben [1,43].



Die Zugabe von Akzeptoren bewirkt eine zum Teil erhebliche Erhöhung der Geschwindigkeit des Gesamtumsatzes. Dies deutet darauf hin, dass in Gegenwart von Sac als einzigem Substrat die Weiterreaktion des AS-Glc-Intermediats den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt. Besonders eindrucksvoll zeigt sich diese Steigerung bei Zugabe von Glycogen, einem aus größtenteils α -1,4-verknüpften Glc-Einheiten bestehenden Polysaccharid (Glycogen-Aktivator-Effekt) [40]. Glycogen bewirkt die bislang größte ermittelte Zunahme der AS-Aktivität. Dabei wird für Glycogen auch die Möglichkeit einer zusätzlichen aktivierenden Wirkung durch Einfluss auf die AS-Konformation diskutiert [44].

1.4. Fragestellungen und Vorüberlegungen

Die Nutzbarkeit von AS zur Erzeugung verschiedenster Oligosaccharide oder Glycokonjugate wird unter anderem eingeschränkt durch ein zu enges Donor- und Akzeptor-Spektrum sowie die unlimitierte Anknüpfung von Zuckerresten an das Akzeptor-Molekül bzw. seine Elongationsprodukte. Eine gezielte Veränderung bzw. Erweiterung des engen Substratspektrums, beispielsweise zur Übertragung eines anderen Zuckerrestes als Glc, wurde bislang nicht durchgeführt. Auch die Zusammenhänge zwischen spezifischen AA-Substitutionen und ihren Auswirkungen auf die Akzeptor-Bindung bzw. Kettenverlängerung sind weitgehend unbekannt.

Daher sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden: Welche AAn haben einen kritischen Einfluss auf die Donor-Substratspezifität in Bezug auf den übertragenen Zuckerrest des Substrats, in diesem Fall also den Glc-Teil? Welche AAn sind an der Elongation der Maltooligosaccharide entscheidend beteiligt? Kann das Enzym so verändert werden, dass der Transfer anderer Zucker als Glc möglich wird? Kann das Enzym so verändert werden, dass die Addition von Zuckerresten an einen Akzeptor auf einen oder wenige Reste begrenzt werden kann?

Molekularbiologische Techniken der Enzymveränderung bieten prinzipiell die Möglichkeit, Modifizierungen von Eigenschaften herbeizuführen. Die Konzipierung entsprechender Enzymvarianten ist umso präziser möglich, je mehr über die Struktur und

Mechanismen des fraglichen Enzyms bekannt ist. Der Begriff Enzymvarianten wird hier gebraucht im Sinne von Varianten, in denen AAn des Wildtyps (WT) durch andere natürlich vorkommende AAn ersetzt sind. Sie werden durch entsprechende Veränderungen auf genetischer Ebene erzeugt. Zu diesem Zweck war es zunächst notwendig, das Gen zu isolieren. Da bisher kein effizientes Expressionssystem für das Enzym existierte, sollte versucht werden, ein solches zu entwickeln.

Die Veränderung eines Enzyms kann prinzipiell unterschiedlich entweder durch den gezielten Austausch einzelner oder mehrerer AAn (Rationales Design [27,45-47]) oder durch Einführung zufälliger Änderungen von AAn im Protein (Gerichtete Evolution [48-53]) erfolgen.

Die zu testende Anzahl von Varianten ist im ersten Fall meist überschaubar niedrig. Dieser Ansatz setzt jedoch umfassende Kenntnisse von strukturellen Elementen und ihrem Beitrag zur Funktion voraus. Selbst wenn diese vorliegen, führt diese Vorgehensweise jedoch aufgrund ungenügender Vorhersagbarkeit des Effekts einer Sequenz-Änderung auf die Struktur in vielen Fällen nicht zum Erfolg [49].

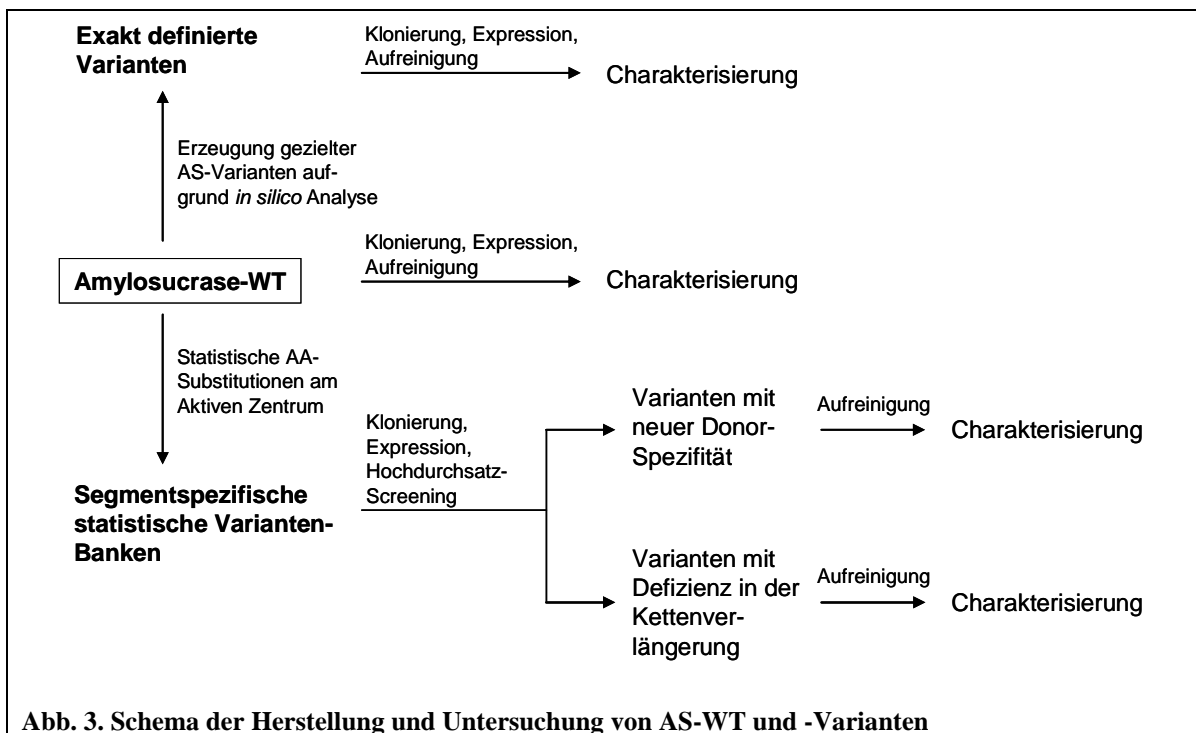


Abb. 3. Schema der Herstellung und Untersuchung von AS-WT und -Varianten

Bei der ungerichteten Mutagenese werden das gesamte Gen oder Teile desselben mehr oder weniger statistisch verändert. Zu diesem Zweck sind diverse Techniken zur DNA-Manipulation entwickelt worden [54-56]. Die Anzahl der erzeugten Varianten ist bei dieser Vorgehensweise typischerweise sehr groß. Daher muss durch geeignete Selektions- oder Screeningverfahren nach verbesserten Varianten gesucht werden. Für die Veränderung der Substratspezifität spielen hauptsächlich AAn im Aktiven Zentrum und in seiner Umgebung eine Rolle. Bei einer Mutagenese nur dieser Regionen ist daher ein höherer Anteil positiv veränderter Varianten zu erwarten als bei einer Mutagenese des gesamten Gens.

Wegen der guten Charakterisierung des Enzyms aus *N. polysaccharea* [22,35,36,57] sollten zur Erzeugung von Varianten zum Teil beide Strategien verfolgt werden (siehe Abb. 3): Zum einen sollten durch *in-silico*-Analysen AAn für eine gezielte Änderung des Enzyms ausgewählt werden, zum anderen sollten kurze AA-Segmente in der Umgebung des Aktiven Zentrums für lokal begrenzte statistische Änderungen ausgewählt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Bio-Rad, Merck, Invitrogen, Qiagen, Roth und Sigma-Aldrich im Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen. Die Reinheit der nicht kommerziell bezogenen Zucker (Sac-Analoga) ist im Ergebnisteil angegeben. Das doppelt destillierte und gefilterte Wasser (ddH₂O) besaß einen Leitungswiderstand von 18,2 Megaohm.

Starter-Oligonucleotide (Primer) wurden von MWG Biotech (Ebersberg) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen, mit Ausnahme des mutagenen Primers zur Herstellung der Bank 5H, der von IBA (Göttingen) bezogen wurde. Die Sequenzen aller Oligonucleotide sind in den Tab. 7 und 9-12 angegeben. Primer, die Bestandteile klonierter DNA-Segmente blieben, wurden mit dem höchstmöglichen Reinheitsgrad bestellt (MWG: HYPUR, Invitrogen, IBA: PAGE). Oligonucleotide, die durch Restriktionsverdau von PCR-Produkten entfernt oder für Sequenzierungen verwendet wurden, wurden entsalzt (*desalted*) geordert.

2.2. Nährmedien und Stammlösungen

2.2.1. Nährmedien

2.2.1.1. Brain-Heart-Infusion-Medium

Vollmedium für die Anzucht von *Neisseria polysaccharea* [58,59]

Brain Heart Infusion (Difco)	37,0 g
Deionisiertes Wasser	ad 1000 ml

Das Medium wurde durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert und sowohl in flüssiger, als auch, durch Zugabe von 15,0 g/l Bacto-Agar (Difco), in fester Form verwendet.

2.2.1.2. LB-Medium

Vollmedium für Bakterien nach Luria-Bertani [60]

Bacto-Tryptone (Difco)	10,0 g
Hefeextrakt (Difco)	5,0 g
NaCl	10,0 g
Deionisiertes Wasser	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Das Medium wurde sowohl in flüssiger, als auch durch Zugabe von 15,0 g/l Bacto-Agar, in fester Form verwendet.

2.2.1.3. LB-freeze-Medium

Vollmedium für Bakterien zur Lagerung als Dauerkulturen in Mikrotiterplatten (MTPn) [61]

10x Salzlösung	
1 M K_2HPO_4	360 ml
1 M KH_2PO_4	132 ml
170 mM Na-Citrat	100 ml
1 M $MgSO_4$	4 ml
1 M $(NH_4)_2SO_4$	68 ml
Deionisiertes Wasser	ad 1000 ml

Die Salzlösungen wurden separat sterilfiltriert und erst vor Gebrauch vereinigt, um ein Auskristallisieren zu vermeiden.

Bacto-Tryptone (Difco)	10,0 g
Hefeextrakt (Difco)	5,0 g
NaCl	10,0 g
Glycerin [100 %]	49 ml
Deionisiertes Wasser	ad 1000 ml

Das obige Medium wurde durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. 900 ml davon wurden mit 100 ml der 10x Salzlösung unter sterilen Bedingungen zum vollständigen Medium vereinigt.

2.2.1.4. SOC-Medium

Vollmedium für Bakterien nach der Transformation [62].

Bacto-Tryptone (Difco)	2,0 g
Hefeextrakt (Difco)	0,6 g
1 M NaCl-Lösung	1,0 ml
1 M KCl-Lösung	1,0 ml
Deionisiertes Wasser	95,0 ml

Das obige Medium wurde durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Nach Abkühlung auf unter 50°C wurden zum Vervollständigen folgende sterilfiltrierte, wässrige Lösungen unter sterilen Bedingungen hinzugegeben:

1 M $MgSO_4$ -Lösung	1,0 ml
1 M $MgCl_2$ -Lösung	1,0 ml
2 M Glucose-Lösung	1,0 ml

2.2.2. Stammlösungen

2.2.2.1. Antibiotika-Lösungen

Tab. 1 enthält die eingesetzte Konzentration der Antibiotika-Stammlösungen sowie das verwendete Lösungsmittel.

Tab. 1. Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel
Ampicillin	200	ddH ₂ O
Kanamycin	50	ddH ₂ O
Chloramphenicol	25	Ethanol

Die Stammlösungen von Ampicillin und Kanamycin wurden sterilfiltriert. Alle drei wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.2. 25x PBS Stammlösung (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

Reaktionspuffer für Amylosucrase [60] (leicht abgeändert).

		<u>Endkonzentration</u>
NaCl	204,5 g	3,5 M
KCl	5,03 g	67,5 mM
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	37,6 g	200 mM
KH ₂ PO ₄	5,10 g	37,5 mM
Deionisiertes Wasser	ad 1000 ml	

Mit H₃PO₄ wurde der pH-Wert der 25x Stammlösung vor dem Auffüllen auf ca. 6,2 eingestellt, so dass der pH bei Verdünnung auf die einfache Puffer-Konzentration auf den gewünschten Wert von 7,3 anstieg. Der Puffer wurde durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert.

2.2.2.3. Aufbewahrungspuffer 1 für gereinigte AS

Puffer für die Aufbewahrung von aufgereinigten AS-Präparationen nach der Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie [25].

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
DTT	1 mM
EDTA	1 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt. Der Puffer wurde nicht sterilisiert.

2.2.2.4. Aufbewahrungspuffer 2 für gereinigte AS

Puffer für die Aufbewahrung von aufgereinigten AS-Präparationen nach der Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie.

PBS	1	x
DTT	1	mM
EDTA	1	mM

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt. Der Puffer wurde nicht sterilisiert.

2.2.2.5. Coomassie-Färbelösung für Proteingele

Färbelösung für denaturierende Proteingele [60] (leicht abgeändert).

Coomassie Brilliant Blue R250	0,5	g	0,25 % (w/v)
Eisessig	50	ml	
Methanol	250	ml	
Deionisiertes Wasser	200	ml	

Die Lösung wurde gerührt bis sich der Farbstoff vollständig gelöst hatte und anschließend über ein Faltenfilter filtriert.

2.2.2.6. Tris-Glycinpuffer

10x Elektrophoresepuffer für denaturierende Proteingele [60].

Tris	30,0	g
Glycin	144,0	g
SDS	10,0	g
Deionisiertes Wasser	ad 1000	ml

Der pH-Wert der Lösung wurde nicht eingestellt.

2.2.2.7. Entfärbelösung I für Proteingele

Lösung zum schnellen Entfärben von Proteingelen [60].

Methanol	300	ml
Eisessig	100	ml
Deionisiertes Wasser	600	ml

2.2.2.8. Entfärbelösung II für Proteingele

Lösung zum langsamen Entfärben von Proteingelen (persönliche Mitteilung S. Wittrock).

Methanol	50 ml
Ethanol	70 ml
Deionisiertes Wasser	880 ml

2.2.2.9. Aufbewahrungslösung für Proteingele

Lösung zum Aufbewahren von entfärbten Proteingelen (persönliche Mitteilung S. Wittrock).

Ethanol	350 ml
Glycerin	20 ml
Deionisiertes Wasser	630 ml

2.2.2.10. SDS-Lösung 10 % (w/v)

Es wurden 10 g Natriumdodecylsulfat (SDS) ad 100 ml in deionisiertem Wasser gelöst und durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert.

2.2.2.11. Puffer für Polyacrylamid-Trenngel-Lösung

Pufferkomponente der Gellösung für ein 12,5 %iges Trenngel [60].

Tris	91 g
SDS (10 %)	20 ml
Deionisiertes Wasser	ad 500 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde mit konzentrierter HCl auf 8,8 eingestellt.

2.2.2.12. Puffer für Polyacrylamid-Sammelgel-Lösung

Pufferkomponente der Gellösung für ein 4 %iges Sammelgel [60].

Tris	30,5 g
SDS (10 %)	20 ml
Deionisiertes Wasser	ad 500 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde mit konzentrierter HCl auf 6,8 eingestellt.

2.2.2.13. His-tag-Fixier- und Waschlösung

Lösungen für die spezifische Färbung von 6x His-tags. Nach Herstellerangaben angesetzt (beide: „InVision His-tag In-gel Stain“, Invitrogen) .

Fixierlösung:

Ethanol	40	ml
Eisessig	10	ml
ddH ₂ O	ad 100	ml

Waschlösung:

NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2,8	g	(20 mM)
Einstellen mit 3 M NaOH auf pH 7,8			
ddH ₂ O	ad 1000	ml	

2.2.2.14. DC-Entwickler-Lösung

Entwickler für Dünnschichtchromatographien [63]

Ethylacetat	600 bzw. 500	ml
Isopropanol	300 bzw. 400	ml
Deionisiertes Wasser	100	ml

2.2.2.15. DC-Färbelösung

Färbelösung für Zucker [64]

N-(1-naphtyl)-ethylendiamin · 2 HCl	1,5	g
Methanol	475	ml
Konzentrierte Schwefelsäure	25	ml

2.2.2.16. TAE-Puffer (50x)

Puffer für Agarose-Gelelektrophorese [60]

Tris	242,0	g
Eisessig	57,1	ml
0,5 M EDTA (pH 8,0, eingestellt mit NaOH)	100	ml
Deionisiertes Wasser	ad 1000	ml

Der Puffer wurde nicht sterilisiert.

2.2.2.17. Gelbeladelösung für DNA-Proben

6x Ladepuffer für Agarose-Gelelektrophorese [60]

Bromphenolblau	2,5	mg
Xylencyanol (FF)	2,5	mg
Glycerin (30 %)	ad 10	ml

Die Lösung wurde nicht sterilisiert.

2.3. Molekulargenetische Methoden

2.3.1. Extraktion von Kleinmengen von DNA aus *Neisseria polysaccharea*

Für die Extraktion von für die PCR ausreichenden Mengen von Gesamt-DNA aus *Neisseria polysaccharea* wurden die Bakterienzellen von einer Brain-Heart-Infusion-Agar-Platte mit einem sterilen Zahnstocher abgekratzt, in 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 resuspendiert und 7 min bei 100°C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 13000 rpm und RT in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand direkt als DNA-Matrize in eine PCR eingesetzt.

2.3.2. Standardbedingungen für Über-Nacht-Kulturen

Von dem gewünschten *E.-coli*-Stamm wurde eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und in 3 ml LB-Medium ÜN bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Bei Selektion auf Plasmide wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt (siehe Tab. 6, Kapitel 2.4.2.1).

2.3.3. Plasmid-DNA-Minipräparation

Von dem entsprechenden *E.-coli*-Stamm wurde unter Standardbedingungen eine ÜNK angezogen. Von dieser Kultur wurden 2 ml in 2,0-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus dem Zellpellet präpariert. Eluiert wurde mit 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5. Das Elutionsvolumen betrug zwischen 32 und 50 µl.

2.3.4. Plasmid-DNA-Midipräparation

Es wurden 25 ml LB-Medium unter Standardbedingungen inkubiert (2.3.2). Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die von der Säule eluierte Plasmid-DNA wurde auf sechs Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und nach Präzipitation und Waschen im letzten Schritt in 6x 50 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gelöst.

2.3.5. Photometrische Quantifizierung von DNA

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 4 µl einer DNA-Probe mit 60 µl ddH₂O in einer Küvette (UVette®, Eppendorf) gut vermischt. Anschließend wurde in einem BioPhotometer (Eppendorf) die Absorption bei 260 nm gegen Wasser gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine optische Dichte von 1 etwa einer Konzentration von 50 ng/µl unverdünnter, doppelsträngiger DNA.

2.3.6. Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Konzentration der Agarose (SeaKem LE Agarose, Cambrex Bio Science, Rockland, Maine, USA) lag je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente bei 0,7 bis 2,0 % (w/v). Das Agarosepulver wurde in 1x-TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Die Lösung wurde in horizontale Gelträger gegossen und nach dem Erstarren in einer Elektrophoresekammer (Horizon 58, Whatman) mit 1x-TAE-Puffer überschichtet.

Zum Beladen wurden die DNA-Proben im Verhältnis 1:6 mit 6x Ladepuffer vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Spannung betrug maximal 6 V/cm (Netzgerät: Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia Biotech). Als Längenmarker wurden Hyperladder™ I, IV und V (Bioline, London, GB) verwendet.

Zum Anfärben der DNA wurde das Gel für ca. 15 min in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (1 mg/ml) gelegt. DNA-Banden wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Geldokumentation (BioPrint/Vilber Lourmat, Eberhardzell) fotografiert. Falls notwendig erfolgte die Bestimmung der Fragmentlängen von Banden mit Hilfe der AIDA-Software (1D Evaluation) und DNA-Längenstandards als Referenz.

2.3.7. Präparative Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 0,7-1,0 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (siehe 2.3.6). Anschließend wurden Gelblöcke mit den gewünschten Banden auf einem UV-Transilluminator bei 365 nm Wellenlänge (3UV™ LMS-20E Transilluminator, UVP Upland, USA) mit einem sterilen Skalpell möglichst genau ausgeschnitten. Die Dauer der UV-Anregung wurde dabei kurz gehalten, um die Induktion von Mutationen durch UV-Strahlung soweit wie möglich zu unterbinden. Der so erhaltene Gelblock wurde auf einer Analysenwaage gewogen und die DNA mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen Inc.) nach Herstellerangaben isoliert. Eluiert wurde mit 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5. Das Elutionsvolumen betrug zwischen 32 und 50 µl. Ein kleiner Teil der gereinigten DNA wurde zwecks Überprüfung der Aufreinigung erneut per Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.3.8. Chromatographische Aufreinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Ansätze und Dephosphorylierungsreaktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, immer mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Eluiert wurde mit 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5. Das Elutionsvolumen betrug zwischen 32 und 50 µl.

2.3.9. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Da die experimentell erzielten Umsatzraten der Restriktionsendonukleasen oftmals unter den theoretisch erzielbaren lagen, wurde mit einem 2- bis 20-fachen Überschuss und einer verlängerten Inkubationszeit gearbeitet. Verwendet wurden der vom Hersteller empfohlene Puffertyp sowie die empfohlene Inkubationstemperatur.

Im Falle eines gleichzeitigen Verdaus mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen (Doppelverdau) wurde der Puffer gewählt, mit dem beide Enzyme eine möglichst optimale Aktivität erreichen. Wenn möglich und nicht anders erwähnt, wurden die Enzyme nach Abschluss der Reaktion nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert. Ein kleiner Teil des Verdaus wurde immer per Agarose-Gelelektrophorese zusammen mit unverdauter DNA als Vergleich analysiert.

2.3.10. Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren/Plasmiden

Dephosphorylierungen wurden mit Alkalischer Phosphatase aus Eismeergarnelen („Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP), Fermentas) durchgeführt. Das Enzym wurde entweder direkt dem Restriktionsverdau zugesetzt, oder nachträglich nach dessen Hitzeinaktivierung.

Dephosphorylierungsansatz:

Restriktionsansatz, hitzeinaktiviert (ca. 4 µg einer Plasmid-DNA mit ca. 6,6 kbp)	110 µl	
SAP [1 U/µl]	8 µl	
(SAP-Puffer, 10-fach)	13 µl	

Die Zugabe des SAP 10x-Puffers war nur notwendig, falls der Restriktionsansatz zuvor aufgereinigt worden war. Die eingesetzte Enzym-Konzentration entsprach den Angaben des Herstellers. Der Dephosphorylierungsansatz wurde in 0,5-ml Reaktionsgefäßen für 3-4 h bei 37°C inkubiert, 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert und anschließend mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die DNA war danach in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gelöst.

2.3.11. A-Addition von PCR-Produkten

Für die Ligation in den pGEM-T Easy Vektor (Promega) wurde den mit *Pfu*-DNA-Polymerase generierten PCR-Produkten mit nachstehender Reaktion ein 3'-Adenosin (A-Überhang) angefügt. Das Protokoll für die Additionsreaktion wurde dem „Technical Manual“ für den pGEM-T Easy Vektor der Firma Promega entnommen. Die Konzentration der *Taq*-DNA-Polymerase wurde gegenüber dem Originalrezept annähernd halbiert.

A-Addition-Reaktionsansatz:

Gel-gereinigtes (2.3.7) PCR-Produkt (<i>Pfu</i>) [ca. 15 ng/µl]	13 µl	
dATP [2 mM]	2,5 µl	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase [1 U/µl]	5 µl	Fermentas
10x <i>Taq</i> -DNA-Polymerasepuffer ohne MgCl	2,5 µl	Fermentas
MgCl [25 mM]	2 µl	

Der Ansatz wurde in 0,5-ml-Reaktionsgefäßen für 25 min bei 70°C inkubiert und anschließend mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.8). Die DNA war danach in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gelöst.

2.3.12. Auffüllen 5'-überhängender Enden doppelsträngiger DNA

Der Vektor pET-33b(+) wurde per Restriktionsverdau mit dem Enzym *SgrAI* linearisiert. Das Enzym wurde durch Hitze inaktiviert, und der Ansatz wurde ohne Aufreinigung in die nachstehende Auffüll-Reaktion eingesetzt. Das Protokoll wurde der Anleitung für die T4-DNA-Polymerase der Firma Fermentas entnommen. Abweichend wurde eine größere Enzymmenge pipettiert, um den Pipettierfehler gering zu halten.

Auffüll-Reaktion:

Linearisierter Vektor pET-33b(+) (nicht aufgereinigter Verdau) [ca. 10 ng/µl]	20 µl	
T4-DNA-Polymerase [5 U/µl]	1 µl	Fermentas
5x Puffer für T4-DNA-Polymerase	6 µl	Fermentas
dNTPs [2 mM]	2 µl	

Der Reaktionsansatz wurde in 0,5-ml-Reaktionsgefäßen für 5 min bei RT inkubiert, die Polymerase für 10 min bei 75°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde mit dem

„QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.8). Die DNA war danach in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gelöst.

2.3.13. Ligationsreaktion

Nachstehend ist ein Beispiel für eine Ligationsreaktion aufgeführt. Abweichend von den Herstellerangaben (Fermentas) wurde eine verlängerte Inkubationszeit bei geringerer Temperatur verwendet. Zur Kontrolle wurde eine Reaktion ohne Insert und meist auch eine Reaktion ohne Ligase, jeweils mit halbem Volumen, durchgeführt. Bei einem erhöhten Bedarf von Ligationsansatz wurden Mengen der einzelnen Komponenten im gleichen Verhältnis vergrößert.

Ligationsansatz:

Insert-DNA-Fragment	36 fmol	
Plasmid-DNA-Fragment	12 fmol	
T4-DNA-Ligase [1 U/μl]	1 μl	Fermentas
10x Ligationspuffer	1 μl	Fermentas
ddH ₂ O	ad 10 μl	

Der Ligationsansatz wurde in 0,5-ml-Reaktionsgefäßen über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend die Ligase für 10 min bei 65°C inaktiviert. Vor einer Elektroporation wurden die im Ligationsansatz vorhandenen Mg²⁺-Ionen durch Zugabe einer 1,5-fach höher konzentrierten EDTA-Lösung komplexiert. Außerdem wurde der Ansatz zusätzlich mittels eines Reinigungsharzes (StrataClean™ Resin, Stratagene) nach Herstellerangaben gereinigt und entsalzt. Die DNA lag danach in der StrataClean-Lösung vor (Zusammensetzung unbekannt).

2.3.14. Transformation von *Escherichia coli*

2.3.14.1. Transformation von chemokompetenten Zellen

Das Protokoll für die Transformation stammt von Invitrogen. Das Probenvolumen wurde auf ein Fünftel des Originalrezepts verringert.

In eiskühlte 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 1 μl einer verdünnten Plasmid-DNA-Präparation (2.3.3) oder 1-3 μl eines Ligationsgemisches (2.3.13) vorgelegt. Kompetente Zellen wurden im Eisbad aufgetaut und 18 μl davon anschließend vorsichtig zupipettiert und vermischt. XL10-Gold *E.-coli*-Zellen (Stratagene) wurden zuvor nach Herstellerangaben mit β-Mercaptoethanol vorbereitet. Nach 30 min Inkubation im Eisbad folgten ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad und eine Inkubation von weiteren 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 180 μl SOC-Medium wurde 1 h bei 37°C und 500 rpm Schütteln (Thermomixer Comfort, Eppendorf) inkubiert. Je nach zu erwartender Anzahl Transformanden wurden zwischen 10 und 150 μl der Zellsuspension auf Petrischalen mit festem Selektivmedium ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.3.14.2. Transformation von elektrokompetenten Zellen

Das Protokoll der Elektroporation wurde dem „Instruction Manual“ für die Verwendung der ElectroTen-Blue-Zellen der Firma Stratagene entnommen. Abweichend wurde das verwendete Volumen an kompetenten Zellen verringert und die der Elektroporation folgenden Inkubationsbedingungen (Dauer und Reaktionsgefäß) leicht geändert.

Die elektrokompetenten Zellen wurden im Eisbad aufgetaut. In eisgekühlte 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 0,5-2,0 µl entsalzter Ligationsmix (2.3.13) vorgelegt, anschließend 28-29,5 µl Zellen vorsichtig zupipettiert und vorsichtig gemischt. Nach ca. 10 min Inkubation auf Eis wurde diese Suspension in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) pipettiert und sofort elektroporiert. Die Geräte und Einstellungen sind in nachstehender Tab. 2 aufgeführt. Die resultierende Feldstärke betrug bei den verwendeten Küvetten mit 0,1 cm Spalt 22,5 kV/cm. Geräte und Küvetten wurden von Bio-Rad hergestellt.

Tab. 2. Geräte-Parameter bei der Elektroporation von ElectroTen-Blue *E.-coli*-Zellen

Gerätebezeichnung	Einstellung	
Genepulser	Spannung	2250 V
	Kapazität	25 µF
Pulse Controller	Widerstand	200 Ω

Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension direkt in der Küvette mit auf 37°C vorgewärmtem SOC-Medium auf 1 ml aufgefüllt, anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für genau eine Stunde bei 37°C und 500 rpm inkubiert. Je nach zu erwartender Anzahl an Transformanten wurden zwischen 10 und 150 µl auf Petrischalen mit festem Selektivmedium ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.3.14.3. Blau-Weiß-Selektion

Auf Petrischalen mit LB-Agar und 200 mg/ml Ampicillin wurden 150 µl X-Gal [20 mg/ml] und 100 µl IPTG [100 mM] steril zugeben und gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden für 30 min bei 37°C inkubiert, um die Lösungen ins Medium einziehen zu lassen. Je nach zu erwartender Anzahl Transformanten wurden zwischen 10 und 150 µl transformierte XL10-Gold-*E.-coli*-Zellen auf diesem Selektivmedium ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Zur besseren Sichtbarmachung blauer Kolonien wurden die Petrischalen anschließend für ca. 3 h bei 4°C inkubiert.

2.3.15. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Reagenzien-Konzentrationen in der PCR orientieren sich in Bezug auf Puffer, dNTP- und Enzym-Konzentrationen an den Angaben des Herstellers der verwendeten Polymerase. Oligonucleotide wurden so konzipiert, dass die Hybridisierungstemperatur ca. 60°C betrug. Für Ansätze zur weiteren präparativen Verwendung wurde, sofern nicht anders angegeben, die *Pfu*-DNA-Polymerase genutzt, die gegenüber der herkömmlichen *Taq*-DNA-Polymerase eine deutlich geringere Einbau-Fehlerrate bei der Synthese aufweist. Aufgrund der geringeren Geschwindigkeit wurden mehr Enzymeinheiten bei Reaktionen mit *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt als bei der *Taq*-DNA-Polymerase.

Komponenten einer PCR:

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase [2,5 U/ μ l] <u>oder</u>	1 μ l	Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase [1 U/ μ l]	1 μ l	
10x Puffer DNA-Polymerase Reaktionspuffer	5 μ l	Fermentas
BSA [10 mg/ml]	2 μ l	NEB
dNTPs [2mM]	5 μ l	
Oligonucleotide [10 μ M]	je 2,5 μ l	
Matrizen-DNA [ca. 5 ng/ μ l]	1 μ l	
ddH ₂ O	ad 50 μ l	

Ein typisches Temperatur-Programm für den Thermocycler ist in Tab. 3 angegeben. Abhängig von der Sequenz der Primer oder der nachfolgenden Nutzung der PCR-Produkte wurden die Hybridisierungstemperatur, die Anzahl der Zyklen und die Elongationszeit angepasst, um geeignete Resultate zu erzielen.

Tab. 3. Temperaturprogramm einer PCR

Temperatur	Inkubationsdauer	Anzahl der Zyklen
94°C	60 s	1
94°C	30 s	25
56°C	30 s	
72°C	60 s	
72°C	4 min	1
4°C	Bis zur Entnahme	

Ein Aliquot der Reaktion (1-2 μ l) wurde anschließend mit DNA-Ladepuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.3.6). Eine Aufreinigung präparativer PCR-Ansätze erfolgte mit Säulenreinigung (siehe Kapitel 2.3.8) oder über ein Agarose-Gel mit anschließender Elution (siehe Kapitel 2.3.7). Die DNA war danach in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gelöst.

2.3.16. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde das „BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) nach Herstellerangaben eingesetzt. Als DNA-Matrize diente dabei per „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (2.3.3) isolierte Plasmid-DNA oder per „QIAquick PCR Purification Kit“ (2.3.8) gereinigtes PCR-Produkt. Die Sequenzier-Reaktion wurde im Thermocycler unter Verwendung des Sequenzier-Programms aus Tab. 4 durchgeführt.

Tab. 4. Temperaturprogramm für die Sequenzier-Reaktion

Temperatur	Inkubationsdauer	Anzahl der Zyklen
96°C	60 s	1
96°C	20 s	27
56°C	20 s	
60°C	4 min	
4°C	Bis zur Entnahme	

Die anschließende Aufreinigung der Ansätze erfolgte gemäß Herstellerangaben mit Hilfe des „DyeEx™ 2.0 Spin Kit“ bzw. des „DyeEx™ 96 Kit“ (Qiagen, Hilden). In einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf) wurden die Proben bis zur vollständigen Trockne eingengt und bis zur weiteren Verwendung dunkel und bei -20°C

gelagert. Nach Wiederaufnahme der Sequenzier-Produkte in 10 µl HiDi™-Formamid (Applied Biosystem) wurden die Proben in einer 96-Mulden-*Deep-Well*-Platte im Sequenzier-Automaten analysiert. Die Auftrennung und Detektion der Produkte erfolgte unter Verwendung des 16-Kapillar-Sequenzier-Automaten ABI Prism Genetic Analyzer 3130 xl (Applied Biosystem). Die gesammelten Sequenz-Rohdaten wurden mit Hilfe der Analysesoftware Sequencher™ 4.1.4 (Gene Codes Co., USA) überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert.

2.4. Mikroorganismen und Plasmid-DNA

2.4.1. *Neisseria polysaccharea*

Der *Neisseria-polysaccharea*-Stamm ATCC 43768 [31] wurde von der Culture Collection der Universität Göteborg, Schweden (CCUG) bezogen.

2.4.2. *Escherichia-coli*-Wirtsstämme

Als Wirtsstamm für die Klonierung und Expression der Amylosucrase-Gene diente *E. coli*. Tab. 5 zeigt die zur Transformation verwendeten Stämme.

Tab. 5. Wirtsstämme für die Klonierung des AS-Gens

Stamm	Genotyp	Qualität der kompetenten Zellen	Lieferant
BL21*(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B</i> (r _B -m _B -) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	BL21 Star™ (DE3) One Shot® Chemically Competent Cells	Invitrogen
DH5α	F- φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> ⁻	Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells	Invitrogen
ElectroTen-Blue	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Kan^r</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	ElectroTen-Blue® Electroporation Competent Cells	Stratagene
XL10-Gold	Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZ ΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r]	XL10-Gold® Ultracompetent Cells	Stratagene

2.4.2.1. Vektoren

Folgende Vektoren wurden zur Klonierung und Expression von AS-Genen verwendet:

Tab. 6. Vektoren für das AS-Gen

Name	Resistenzgen gegen Antibiotikum	Lieferant	Name des konstruierten Plasmids mit AS-Gen
pGEM-T Easy	Ampicillin	Promega	pJGA1000
pET-33b(+)	Kanamycin	Novagen	pJEA1000
pQE-81L	Ampicillin	Qiagen	pJQA1000

2.4.2.2. Konstruktion von *Escherichia coli*-Stämmen mit dem Wildtyp-AS-Gen

Das AS-Gen wurde unter Verwendung des Oligonucleotidpaares aus Tab. 7 aus genomischer DNA von *N. polysaccharea* (2.3.1) in einer PCR mit *Pfu*-DNA-Polymerase [65] (Fermentas, St. Leon-Rot) amplifiziert (2.3.15). Das Temperaturprofil der PCR ist in Tab. 8 gezeigt. Ein Aliquot der Reaktion (2 µl) wurde anschließend mit DNA-Ladepuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.3.6). Das PCR-Produkt wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt (2.3.8). Die DNA war danach in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gelöst.

Tab. 7. Plasmid-Konstrukte mit einem Wildtyp-AS-Gen

Plasmid-Konstrukt	Vektor	Kloniertes Fragment	DNA-Matrize	Oligonucleotidpaare für die PCR-Synthese des WT-AS-Gens ¹⁾
pJGA1000	pGEM-T Easy	Gesamtes PCR-Fragment	Genomische DNA aus <i>N. polysaccharea</i>	5'-Strang: CAT TTG CAG GAT ACG GCG GC 3'-Strang: CAT TCG GGA <u>AGC</u> <u>TTG</u> CGT CAG GC

¹⁾ Die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Hind*III ist unterstrichen. Unterschiede zur WT-AS-Gen-Sequenz in fett.

Durch A-Addition (siehe Kapitel 2.3.11) wurde ein 3'-Adenosin-Überhang an das PCR-Produkt angefügt. Die so modifizierte DNA wurde über QIAquick-Säulen (2.3.8) gereinigt und in eine Ligationreaktion mit dem Vektor pGEM-T Easy eingesetzt (2.3.13). Mit den Ligationprodukten wurde der *E. coli*-Stamm XL10-Gold wie in Kapitel 2.3.14.1 beschrieben transformiert. Die Indikation erfolgreicher Insertion des AS-Gens erfolgte nach dem Prinzip der α -Komplementation durch ausbleibende Blaufärbung der Kolonien in Gegenwart von X-Gal (2.3.14.3).

Tab. 8. Temperaturprogramm für die Amplifikation des AS-Gens aus *N. polysaccharea*:

Temperatur	Inkubationsdauer	Anzahl der Zyklen
94°C	5 min	1
94°C	40 s	25
58°C	40 s	
72°C	180 s	
72°C	10 min	1
4°C	Bis zur Entnahme	

Für die Analyse der Klone wurden die Plasmide weißer Kolonien isoliert (2.3.3) und einem Restriktions-Doppelverdau mit *Hind*III und *Xmn*I unterzogen (2.3.9). Die singuläre *Xmn*I-Schnittstelle befindet sich ca. 2 kbp vom Insertionsort entfernt in der für β -Lactamase codierenden Region des Vektors. Durch die Analyse konnte einerseits die Intaktheit der neu eingeführten *Hind*III-Restriktionsschnittstelle geprüft und andererseits durch ihre Position, erkennbar anhand des entstehenden DNA-Schnittmusters, die Orientierung des Inserts im Vektor ermittelt werden. Plasmide mit positivem Ergebnis wurden sequenziert (siehe Kapitel 2.3.16). Die dafür verwendeten Primer sind in Tab. 9 angegeben.

Tab. 9. Zur Sequenzierung des WT-AS-Gens verwendete Oligonucleotide

Oligonucleotid-Bezeichnung	Sequenzier-Richtung	Oligonucleotid-Sequenz
M13F ¹⁾	5'-Strang	5' - GACGTTGTAAAACGACGGCCAG
Ams F534		5' - TGGTTTGACTTATCTGCACCTG
Ams F1090		5' - GCGTTCAATGCCGTTATGCG
Ams F1577		5' - GCATTGCTTTGAGTACCGGC
M13R ¹⁾	3'-Strang	5' - CACAGGAAACAGCTATGACCATG
Ams R577		5' - CAGGGCATTAAACAGCGGC
Ams R1109		5' - CGCATAACGGCATTGAACGC
Ams R1596		5' - GCCGGTACTCAAAGCAATGC

¹⁾ Oligonucleotid-Bindung erfolgt an der Vektor-DNA, außerhalb des AS-Gens.

Je zirka 50 ng isolierte Plasmid-DNA (beide möglichen Orientierungen) mit der korrekten Sequenz wurden anschließend verwendet, um kompetente BL21*(DE3) *E.-coli*-Zellen zu transformieren.

2.4.2.3. Konstruktion von *Escherichia coli*-Stämmen mit einem His-tag AS-Gen

Tab. 10 gibt einen Überblick über die zur Konstruktion benutzten Komponenten.

Tab. 10. Plasmid-Konstrukte mit einem N-terminal verkürztem AS-Gen

Plasmid-Konstrukt	Vektor	Ligiertes oder kloniertes Restriktionsfragment	DNA-Herkunft	Oligonucleotidpaare für die PCR-Synthese des AS-Gens ¹⁾
pJEA100	pET-33b(+)	<i>EcoRI-HindIII</i>	PCR mit genomischer DNA aus <i>N. polysaccharea</i>	5'-Strang: GTC GGT TTG <u>AAT TCA CAG TAC CTC</u> 3'-Strang: CAT TCG GGA <u>AGC TTG CGT CAG GC</u>
pJEA1000	pET-33b(+) ^{S2)}	<i>EcoRI-HindIII</i>	Restriktion von pJEA100	
pJQA1000	pQE-81L	<i>BamHI-HindIII</i>	Restriktion von pJEA1000	

¹⁾ Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Unterschiede zur WT-AS-Gen-Sequenz in fett.

²⁾ Singuläre *SgrAI*-Erkennungssequenz aus pET-33b(+) entfernt. Konstruktion des Vektors siehe Kapitel 2.4.2.3.1.

2.4.2.3.1. Konstruktion von Plasmiden mit dem AS-Gen auf Basis des Vektors pET-33b(+)

Zur Konstruktion des Plasmids pJEA100 wurde das AS-Gen wie in Kapitel 2.4.2.2 beschrieben amplifiziert. Abweichend wurden die Oligonucleotide aus Tab. 10 sowie eine Hybridisierungstemperatur von 56°C in der PCR verwendet. Das DNA-Fragment enthielt die durch die Primer neu eingefügten Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII*. Sowohl der Vektor pET-33b(+) (Novagen, WI, USA) als auch das PCR-Produkt wurden mit diesem Enzympaar geschnitten (2.3.9) (der Vektor zusätzlich dephosphoryliert, 2.3.10) und über QIAquick-Säulen (2.3.8) gereinigt. Mit der Ligationreaktion (2.3.13) der beiden Produkte wurde der *E.-coli*-Stamm XL10-Gold wie in Kapitel 2.3.14.1 beschrieben transformiert.

Für die Analyse der Klone wurden die Plasmide isoliert (2.3.3) und per Restriktionsverdau mit *BglII* linearisiert. Plasmide korrekter Größe wurden sequenziert (2.3.16). Die dafür verwendeten Oligonucleotide sind in Tab. 9 angegeben. Abweichend wurden anstelle der Oligonucleotide M13F und M13R die Oligonucleotide pETR+5153 (5'-GCA TGA CTG GTG GAC AGC AAA TGG GTC G) und T7-Terminator (5'-GCT

AGT TAT TGC TCA GCG G) verwendet. Die Sequenzierung ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit der WT-Sequenz. Das pJEA100 genannte Plasmid wurde anschließend zur Transformation des *E.-coli*-Expressionsstamms BL21*(DE3) verwendet (siehe Kapitel 2.3.14.1).

Die Konstruktion der Plasmid-DNA pJEA1000 erforderte die Entfernung der *SgrAI*-Schnittstelle aus dem Vektor pET-33b(+). Durch Restriktion mit *SgrAI* wurde der Vektor zunächst linearisiert, danach erfolgte das Auffüllen überstehender Enden (2.3.12) und die Religation des Vektors. Per Restriktionsverdau mit *SgrAI* wurde auf die erfolgreiche Entfernung der Schnittstelle getestet. Der modifizierte Vektor wurde pET-33b(+)S genannt (siehe Tab. 10). Als zweiter Schritt folgte das Einfügen des WT AS-Gens in diesen modifizierten Vektor. Dazu wurde das AS-Gen aus der Plasmid-DNA von pJEA100 mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten, anschließend erfolgte die Ligation des ausgeschnittenen und Gel-gereinigten (2.3.7) Fragments in den gleichermaßen geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pET-33b(+)S. Mit dem Ligationsprodukt wurden XL10-Gold *E.-coli*-Zellen transformiert. Das Plasmid wurde pJEA1000 genannt. Diese Plasmid-DNA wurde in einem zweiten Schritt zur Transformation von BL21*(DE3) *E.-coli*-Zellen verwendet (siehe Kapitel 2.3.14.1). Der Zwischenschritt über die XL10-Gold-Zellen war erforderlich, da aufgrund der geringen Kompetenz der BL21*(DE3)-Zellen keine ausreichenden Transformanden-Zahlen erhalten wurden. Gleiches gilt für die Tyr147-Varianten (siehe Kapitel 2.4.2.4).

2.4.2.3.2. Konstruktion von Plasmiden mit dem AS-Gen auf Basis des Vektors pQE-81L

Die Herstellung des Plasmids pJQA1000 erfolgte durch das Ausschneiden des AS-Gens aus pJEA1000 mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *HindIII* (2.3.9) und die anschließende Ligation des Gel-gereinigten Fragments in den gleichermaßen geschnittenen, dephosphorylierten und Säulen-gereinigten Vektor pQE-81L (2.3.13). Die zusätzliche Reinigung war erforderlich, da die Restriktionsendonuklease *BamHI* nicht hitzeinaktivierbar ist. Die korrekte Insertion des AS-Gens in den Vektor wurde durch erneuten Verdau mit dem gleichen Enzympaar überprüft.

2.4.2.4. Konstruktion von *Escherichia coli*-Stämmen mit im Codon147 mutierten AS-Genen

Über die Schnittstellen *DraI* und *SgrAI* wurde das WT-Segment im Plasmid pJEA1000 gegen mutierte Segmente ausgetauscht. Die zur Herstellung dieser DNA-Segmente in einer PCR verwendeten Oligonucleotide sind in Tab. 11 angegeben. Die PCR-Produkte wurden in einem Doppelverdau mit den beiden oben genannten Restriktionsendonukleasen verdaut und Gel-gereinigt. Plasmid-DNA pJEA1000 wurde auf die gleiche Weise geschnitten und danach dephosphoryliert. Mit der Ligungsreaktion von Insertions-DNA und Vektor-DNA wurden kompetente *E.-coli*-Zellen XL10-Gold wie in Kapitel 2.3.14.1 beschrieben transformiert.

In einigen Fällen ließ sich der Codon-Austausch durch das Entstehen der Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen nachweisen. Für diese Analyse wurde mit dem Oligonucleotidpaar Ams F534 (Tab. 9) und R5784 AS (5'-GAA ATT GTC GAA AAG CGG GTC G) in einer PCR ein ca. 250 bp langes DNA-Fragment erzeugt, das das Codon 147 enthielt. Per Restriktionsverdau mit den in Tab. 11 aufgelisteten Enzymen wurde auf ein gegenüber dem WT geändertes Schnittmuster getestet. Nur Klone mit positivem Ergebnis wurden sequenziert (2.3.16). Für die

Sequenzierung von Hin- und Rückstrang der ausgetauschten DNA-Fragmente aller acht Varianten wurden dieselben Oligonucleotide wie für die oben genannte PCR verwendet.

Tab. 11. Plasmid-Konstrukte mit Tyr147-Austausch

Plasmid-Konstrukt	Oligonucleotidpaare für die PCR-Synthese von Einzelsegmenten ^{1) 2)}	Zur Analyse verwendetes Restriktionsenzym
pJEA147S	5'-Strang: CTG CAC CTG ATG CCG CTG <u>TTT</u> AAA TGC CCT GAA GGC AAA AGC GAC GGC GGC TCT GCG GTC AGC AGC 3'-Strang: GAA ATT GTC GAA AAG CGG GTC G	-
pJEA147A	... GCG	<i>Hin6I</i>
pJEA147T	... ACC	<i>SacII</i>
pJEA147N	... AAC	-
pJEA147D	... GAT	-
pJEA147L	... CTG	<i>ScrFI</i>
pJEA147H	... CAC	<i>EaeI</i>
pJEA147F	... TTC	-

¹⁾ Oligonucleotide sind identisch bis auf das Codon für die AA in Position 147 (in fett).

²⁾ Die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *DraI* ist unterstrichen.

Durch Sequenzierung verifizierte Plasmide wurden anschließend zur Transformation kompetenter Zellen des *E.-coli*-Expressionsstamms BL21*(DE3) (siehe Kapitel 2.3.14.1) verwendet.

2.4.2.5. Erzeugung von Banken von *Escherichia coli*-Stämmen mit statistischen Austauschen in Segmenten des AS-Gens

Die statistische Mutagenese einzelner Regionen oder deren Kombination im AS-Gen erfolgte durch PCR mit Hilfe von degenerierten Oligonucleotiden. Ihre Nucleotid-Sequenz ist in Tab. 12 angegeben. Die Zahl im Plasmidnamen jeder Bank wurde für jedes isolierte Plasmid um jeweils eins erhöht (zum Beispiel pJQA5001 bis pJQA5015 für die ersten 15 Plasmide der Bank 5H). Die Bezeichnungen H und L stehen für hohe (H) bzw. niedrige (L) Mutationsraten (siehe Kapitel 3.3.2.1).

Tab. 12. Erzeugung der Plasmid-Konstrukte mit statistischen Austauschen

Name der Mutanten-/Varianten-bank	Namen ihrer Plasmide	Verwendete Restriktionsfragmente	DNA-Teilfragmente ¹⁾	Oligonucleotidpaare für die PCR-Mutagenese und die Verlängerung der primären Segmente durch „Overlap Extension“ ^{2) 3)}
6H (Region 6)	pJQA6000	<i>AvrII</i> – <i>SalI</i>	OE-1	5'-Strang: GTA CAG CAT TGC TTT GAG TAC CG 3'-Strang: GTC GCT CTT ATT GCT GTC TTG CG
			6H	5'-Strang: C AGC AAT AAG AGC GAC GAC AGC CGT TGG <u>GCG CAC</u> CGT CCG C 3'-Strang: CGG CAA TCA TAT GGC GCA AGC
9H (Region 9)	pJQA9000	<i>ClaI</i> – <i>XmaI</i>	OE-9	5'-Strang: AAG CTA TTC CCA ACG CAA CTC 3'-Strang: ATC GAC GAC GGC GGA AAT GCC GGC
			9H	5'-Strang: C ATT TCC GCC GTC GTC GAT TTT <u>ATC TTC AAC</u> CAC ACC TCC AAC G 3'-Strang: GTC CAC ACC CAG CGT CCG
7/L (Regionen 7 und 1)	pJQA7100	<i>ClaI</i> – <i>XmaI</i>	7L	5'-Strang: AAG CTA TTC CCA ACG CAA CTC 3'-Strang: TTT GCC TTC AGG GCA TTT AAA CAG CGG CAT CAG GTG CAG ATA AG
			1L-I	5'-Strang: AAA TGC CCT GAA GGC AAA AGC GAC <u>GGC GGC</u> TAT GCG GTC AGC AGC 3'-Strang: GTC CAC ACC CAG CGT CCG

Fortsetzung von Tab.12

5/6 (Regionen 5 und 6)	pJQA5600	<i>AvrII – SalI</i> <i>XmaI – SacII</i>	OE-5 5H-I ⁴⁾ OE-6 6H	Siehe Bank 5H und Bank 6H
5H (Region 5)	pJQA5000	<i>XmaI – SacII</i>	OE-5 5H-II	5'-Strang: CCG ACC AAT ACG ACC GCA CCC TG 3'-Strang: GAC GTA GTT GAC CCA GGC G 5'-Strang: TC AAC TAC GTC CGC AGC CAC GAC 3'-Strang: GAC ATC GGC TGG ACG TTT GC 5'-Strang: GAG TTT GAT GCG GTC AAC GGC G 3'-Strang: AAG CTA TTC CCA ACG CAA CTC
7/1/9 (Regionen 7, 1 und 9)	pJQA7190	<i>ClaI – XmaI</i>	7L 1L-II 9L	5'-Strang: TTT GCC TTC AGG GCA TTT AAA 3'-Strang: CAG CGG CAT CAG GTG CAG ATA AG 5'-Strang: AAA TGC CCT GAA GGC AAA AGC 3'-Strang: GAC GGC GGC TAT GCG GTC AGC AGC 5'-Strang: C ATT TCC GCC GTC GTC GAT TTT 3'-Strang: ATC TTC AAC CAC ACC TCC AAC G 5'-Strang: ATC TTC AAC CAC ACC TCC AAC G 3'-Strang: GTC CAC ACC CAG CGT CCG

¹⁾ OE-n = Teilfragment mit WT-Sequenz für die „Overlap-Extension“-Reaktion.

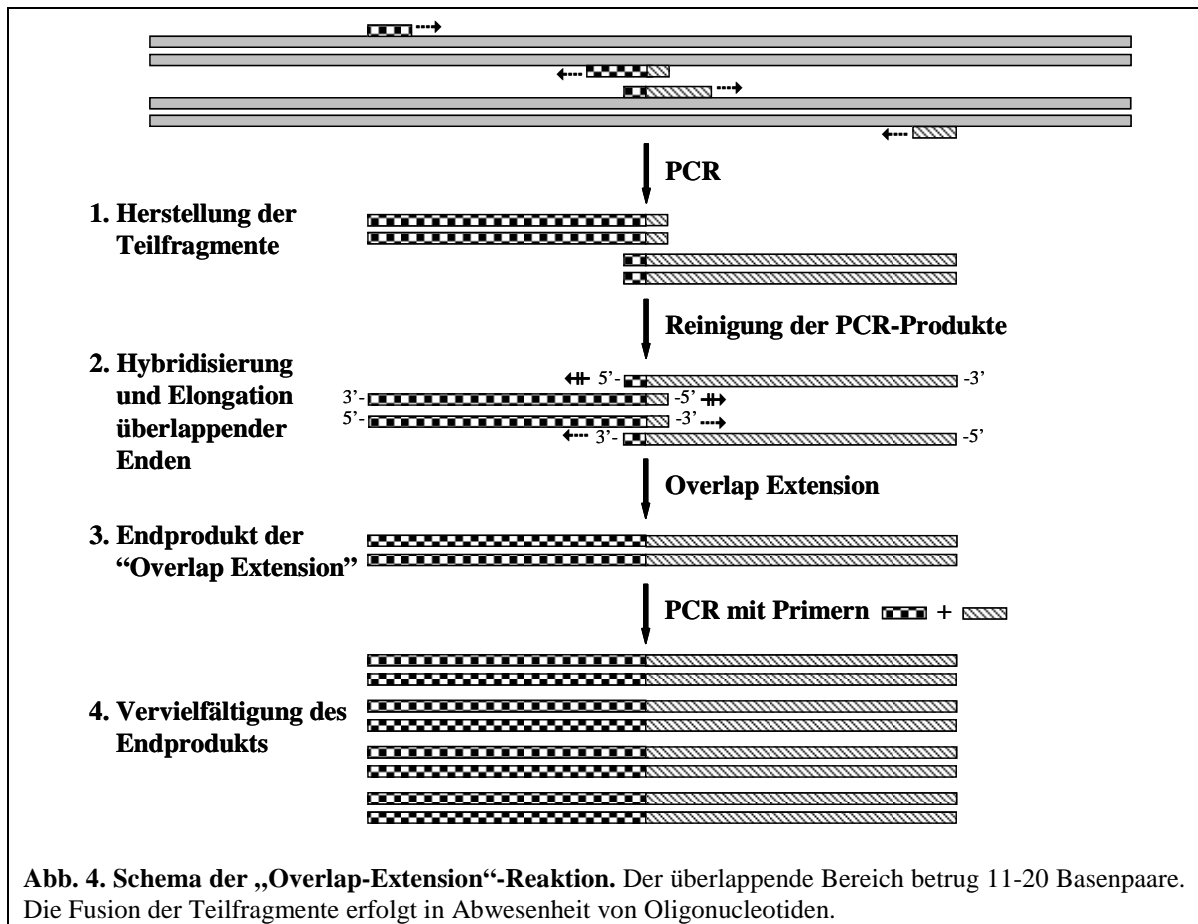
²⁾ Degenerierte Positionen sind unterstrichen.

³⁾ Überlappende Regionen sind fett gekennzeichnet.

⁴⁾ Primer für hohe Mutationsrate konzipiert, aber nach Überprüfung durch Sequenzierung für die Kombination für niedrige Mutationsrate genutzt.

Der Austausch der entsprechenden WT-Segmente durch die mutagenisierten Segmente erfolgte über zwei Restriktionsschnittstellen. Dazu war es stets notwendig, die mutagenisierten PCR-Produkte per „Overlap Extension“ (OE) so zu verlängern, dass das entstehende Produkt diese beiden Erkennungssequenzen beinhaltet.

Eine OE-Reaktion [66] diente dazu, zwei oder mehr DNA-Fragmente ohne eine DNA-Ligase zusammenzufügen (siehe Schema in Abb. 4). Zum Teil mussten mehr als zwei Fragmente fusioniert werden. Das Empfänger-Plasmid war immer pJQA1000, ausgenommen für die Konstruktion der Plasmidbank pJQA5600. Die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen befanden sich nicht in den Sequenzen der beiden äußersten Oligonucleotide, sondern jeweils erst im neu synthetisierten DNA-Strang, d. h. diese flankierenden Oligonucleotide wurden durch den nachfolgenden Restriktionsverdau entfernt.



Die PCR zur Herstellung der Teilfragmente (siehe auch Tab. 12 und Tab. 13) wurde immer mit *Pfu*-DNA-Polymerase durchgeführt, ebenso die Amplifikation der Endprodukte der OE. Die PCR-Ansätze zur Herstellung der Einzelsegmente wurden über QIAquick-Säulen gereinigt und die Fragment-Paare äquimolar in eine anschließende OE-Reaktion eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben gemessen.

„Overlap Extension“ zur Fusion der Teilfragmente:

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase [2,5 U/μl] <u>oder</u>	1 μl	Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase [1 U/μl] ¹⁾	0,75 μl	
10x Puffer DNA-Polymerase	5 μl	Fermentas
Reaktionspuffer		
BSA [10 mg/ml]	2 μl	NEB
dNTPs [2mM]	5 μl	
Zwei bzw. drei DNA Teilfragmente [gereinigtes PCR-Produkt]	je 3-6 pmol	
ddH ₂ O	ad 50 μl	

¹⁾ Wurde mit der *Pfu*-DNA-Polymerase kein oder kein korrektes Fusionsprodukt erhalten, so wurde die Reaktion mit *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt.

In PCR-Vorversuchen mit drei bis vier verschiedenen Hybridisierungstemperaturen im Abstand von 10°C bis 20°C wurde die günstigste Temperatur für eine effektive Fusion der DNA-Fragmente ermittelt (siehe Tab. 13). Als Richtwert für den gewählten Temperaturbereich diente die theoretisch berechnete Hybridisierungstemperatur der jeweiligen Überlappungssequenzen (Berechnung mit PrimerSelect v5.05, DNASTar Inc., Madison, WI, USA).

Tab. 13. Parameter für die Synthese der DNA-Fragmente der statistischen Varianten

DNA-Teilfragmente	Hybridisierungstemperatur zur Amplifikation der Teilfragmente	Hybridisierungstemperatur / Zyklenzahl für die OE ohne äußere Primer	Hybridisierungstemperatur / Zyklenzahl für die OE-PCR mit äußeren Primern
1L-I und 1L-II ¹⁾	50°C	7+1: 50°C / 28 ^{T)}	56°C / 28
7L	50°C		
9L	50°C	7+1+9: 60°C / 28 ^{T)}	
5H-II	60°C	40°C / 28 ^{P)}	56°C / 28
OE-5	56°C		
5H-I	66°C	30°C / 30 ^{P)}	56°C / 25
OE-5	56°C		
6L	56°C	60°C / 25 ^{T)}	56°C / 25
OE-6	50°C		
9H	50°C	60°C / 28 ^{T)}	56°C / 28
OE-9	50°C		
6H	56°C	60°C / 25 ^{T)}	56°C / 25
OE-6	50°C		

¹⁾ Für die beiden Fusionsprodukte zur Herstellung der Banken 7/1 und 7/1/9 wurden zwei unterschiedlich lange Teilfragmente von 1L benötigt (siehe Tab. 12).

^{T)} = *Taq*-DNA-Polymerase zur Fusion der Teilfragmente verwendet.

^{P)} = *Pfu*-DNA-Polymerase zur Fusion der Teilfragmente verwendet.

OE-n = Teilfragment mit WT-Sequenz für die „Overlap-Extension“-Reaktion.

Die Anzahl der Zyklen zur Amplifikation der Teilfragmente betrug immer 30. Ein Teil der OE-Reaktion diente als DNA-Matrize für eine anschließende Vervielfältigung der Fusionsprodukte mit an den Enden hybridisierenden Primern (Oligonucleotide ohne überlappende Bereiche aus Tab. 12). Je fünf parallele Ansätze einer PCR wurden vereinigt und über eine Säule (siehe Kapitel 2.3.8) gereinigt. Die DNA war danach in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gelöst.

PCR zur Amplifikation der Fusionsprodukte:

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase [2,5 U/μl]	1,25 μl	Fermentas
10x Puffer DNA-Polymerase Reaktionspuffer	5 μl	Fermentas
BSA [10 mg/ml]	2 μl	NEB
dNTPs [2mM]	5 μl	
Oligonucleotide [10 μM]	je 2,5 μl	
Matrizen- DNA [OE-Ansatz ¹⁾]	3 μl	
ddH ₂ O	ad 50 μl	

¹⁾ Mit Ausnahme von OE-Ansätzen zur Konstruktion von Bank 6H und 5/6 (Gel-gereinigt, 2.3.7) alle ungereinigt.

Der Austausch von WT-DNA gegen die mutierten Segmente wurde auf die gleiche Weise wie in Kapitel 2.4.2.4 beschrieben per Restriktionsverdau von Insertions- und Plasmid-DNA und anschließende Ligation durchgeführt. Abweichend diente pJQA1000 Plasmid-DNA zur Konstruktion der Banken. Die verwendeten Restriktionsenzym-Paare sind in Tab. 12 angegeben. Mit den Ligationsreaktionen wurden kompetente ElectroTen-Blue *E. coli*-Zellen transformiert (2.3.14.2).

Die Plasmidbank pJQA5600 wurde als einzige in zwei Teilschritten erzeugt. Zunächst wurde das WT Segment *AvrII/SaI* durch Restriktionsverdau aus pJQA1000 entfernt und per Ligation gegen die Segmente der Region 6 mit niedriger Mutationsrate ausgetauscht (siehe Tab. 12). Mit dem Ligationsmix wurden kompetente *E. coli*-Zellen XL10-Gold transformiert. Der komplette Transformationsansatz wurde in einer 50-ml-ÜNK angezogen und die Plasmidbank per Midi-Plasmidpräparation (2.3.4) isoliert. Im zweiten

Schritt wurde dann per Restriktion aus der erhaltenen Plasmidbank das WT-Fragment *XmaI/SacII* entfernt und gegen die Segmente mit mutierter Region 5 ausgetauscht (siehe Tab. 12). Bei allen anderen Banken war nur jeweils ein Segment-Austausch notwendig.

Die Massentransformation mit den Plasmidbanken und Lagerung der resultierenden Klonbanken wird unter Kapitel 2.4.5 beschrieben.

2.4.3. Standardmäßige Kultivierung und Herstellung von Zellextrakten zur Aufreinigung von AS

Die Stämme wurden in 300-500 ml LB-Medium mit Antibiotikum bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,9 angezogen. Anschließend wurde durch Zugabe von IPTG [0,4 mM] die Transkription induziert und für weitere vier Stunden bei 30°C und 120 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 8000 g und 4°C (Sorvall-Kühlzentrifuge RC5C, Rotor GS-3, Thermo Fisher Scientific) vom Medium getrennt und bei -70°C eingefroren. Der Zellaufschluss erfolgte, sofern nicht anders angegeben, per French-Press (2.4.4.2).

2.4.4. Methoden zur Zellyse

Durch die unten aufgeführten Lyse-Methoden erfolgte der Aufschluss der Zellen für eine anschließende enzymatische Charakterisierung der Proteine.

Standardmäßig erfolgte der Zellaufschluss von *E.-coli*-Zellen – sowohl für das Screening der Variantenbanken mit statistischen Austauschen als auch für einen Teil der Versuche mit Kulturvolumina im ml-Maßstab – durch eine Kombination mit dem Detergenz Triton X-100 (1 %) (2.4.4.3) und Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (2.4.4.4).

2.4.4.1. Lyse mit dem „Relay 96 Protein Screen Kit“

Die Bakterienpellets der Kulturkinetik (siehe Kapitel 3.1.2.2) wurden mit 1x PBS auf eine OD₆₀₀ von 15 resuspendiert und in die Vertiefungen einer Filterplatte des „Relay 96 Protein Screen Kit“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) pipettiert. Die Durchführung der Lyse erfolgte nach Herstellerangaben. Der Zentrifugationsschritt zur Elution des löslichen Proteins wurde bei 3300 rpm für 5 min und 4°C in einer Megafuge 2.0 RS (Thermo Scientific, Dreieich) durchgeführt. Anschließend lag das gelöste Protein im Lyse-Puffer vor. Das ungelöste Protein wurde nicht isoliert.

2.4.4.2. Lyse durch French Press

Für die Herstellung von Zellextrakten von *E. coli* mit OD₆₀₀ = 100 im ml-Maßstab (unter anderem für die Aufreinigung von His-tag-AS-Fusionsproteinen, siehe Kapitel 2.5) wurden die *E.-coli*-Stämme zunächst wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben angezogen. Vor der Lyse wurde das Bakterienpellet auf Eis aufgetaut und in NBB (20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 0,1 % Triton X-100 (v/v), 10 mM Imidazol, pH 8,0) auf eine OD₆₀₀ von 100 resuspendiert. Das Volumen nach dem Resuspendieren betrug zwischen 4 und 15 ml. Nach Zugabe von Lysozym (750 µg/ml), RNase A (8 µg/ml) und DNase I (4 µg/ml, alle in Endkonzentration) wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der mechanische Zellaufschluss mittels French Press (Aminco, Silver Spring, USA).

Zylinder und Stempel der French Press wurden bis zur Nutzung auf 4°C gekühlt, um ein Erwärmen der Proben zu vermeiden. Die aufgeschlossenen Proben wurden für 45 min bei 15000 g, 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen, und der Überstand

(Proteinextrakt) bei -70°C in 15 oder 50-ml-Polystyrol-Falcon™-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) gelagert.

2.4.4.3. Lyse durch Detergenz Triton X-100

Diese Lysemethode wurde für die Klone der Variantenbanken (im MTPn-Format, siehe 2.4.6 und 3.3.3.2) sowie für die Überprüfung der Polymer-defizienten Varianten ($OD_{600} = 10-15$, siehe 3.3.4.1) verwendet. Das Detergenz Triton X-100 wurde als 20 %ige Stammlösung (v/v) in ddH₂O gelöst und den Proben in Endkonzentrationen von 0,5 bis 4 % (standardmäßig 1 %) zugesetzt. Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation abgetrennt.

2.4.4.4. Gefrier-Auftau-Lyse

Die Gefrier-Auftau-Lyse wurde im MTPn-Format durchgeführt. Die Mulden einer MTP aus Polypropylen (781201, Greiner Bio-One, Frickenhausen) waren mit je 75 µl einer ÜNK von *E.-coli*-Zellen ElectroTen-Blue befüllt und mit Verschlussfolie (Polyester, H770.1, Roth) zugeklebt. Die MTP wurde für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei RT an der Luft wieder aufgetaut. Sämtliche in Kapitel 3.3.3.2 erwähnten Modifizierungen dieses Verfahrens wurden unter denselben Voraussetzungen durchgeführt. Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation abgetrennt.

2.4.4.5. Lyse durch Lysozym

Lysozym wurde bei der Optimierung der Zelllyse von Klonen für das Hochdurchsatz-Screening im MTPn-Format eingesetzt (siehe 3.3.3.2). Lysozym wurde Zellen einer ÜNK von ElectroTen-Blue (pJQA1000) als Stammlösung (15 g/l) in Endkonzentrationen von 0,25 bis 2 g/l zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei RT. Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation abgetrennt.

2.4.5. Herstellung und Lagerung von AS-Variantenbanken

Kompetente *E.-coli*-Zellen des Stammes ElectroTen-Blue wurden mit dem Ligationmix der entsprechenden Bank transformiert (siehe Kapitel 2.4.2.5). Ein Teil des Transformationsansatzes wurde für eine Bestimmung der Koloniezahl zunächst wie üblich auf LB-Agarplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert (siehe Kapitel 2.3.14.2). Verbleibender Ansatz wurde bei 4°C aufbewahrt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde soviel der restlichen Bakteriensuspension auf QTray-Petrischalen (242x240 mm) (X6023, Genetix, New Milton, UK), ausplattiert, dass zwischen 5000 und 12000 Kolonien wuchsen.

Mit Hilfe des Pick-Roboters QPix2 XT (Genetix) wurden automatisch Kolonien gepickt und in 384-Mulden-*low-profile*-MTPn (X6001, Genetix) überführt, die mit 50 µl LB-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) und Ampicillin (200 µg/ml) vorbefüllt waren. Die Platten wurden für 24 h bei 30°C auf einem GIO-Schüttler (New Brunswick Scientific, Edison, NJ USA) mit 225 rpm inkubiert. Zur Herstellung von lagerungsfähigen Dauerkulturen (im Folgenden „Mutterplatten“ genannt) wurden diese Vorkulturen repliziert. Mit 384-pin-Plastikstempeln aus Polypropylen (QReps, X5053, Genetix) wurde in 384-Mulden-*deep-well*-MTPn mit 175 µl LB-*freeze*-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) und Ampicillin (200 µg/ml) überimpft. Diese Mutterplatten wurden mit gasdurchlässigem Verschlussfilm (T093.1, Roth) und Polypropylen-Deckeln (AB-0755, ABgene, Hamburg) verschlossen, wie die Vorkulturen inkubiert und anschließend bei

-70°C gelagert. Die 384-pin-Stempel wurden dabei mehrfach verwendet und zwischendurch wie folgt chemisch sterilisiert: zweimal 1 min Tauchbad mit Mucosol® (7 %) (Brand, Wertheim), zweimal 1 min Tauchbad mit sterilem ddH₂O, 1 min Tauchbad mit EtOH (70 %), 1 min Tauchbad mit EtOH (100 %), abschließende Lufttrocknung unter der Reinbank.

Für Kontrollen mit der WT-AS (positiv) bzw. dem Wirtsstamm ohne AS-Gen (negativ) wurden insgesamt 12 MTPn in den Positionen B2, B4, B6 und B8 (WT) sowie D2, D4, D6 und D8 (Wirtsstamm) von Hand angeimpft, wie oben beschrieben inkubiert und bei -70°C gelagert. Alle anderen Mulden wurden nicht verwendet. Bei der Herstellung der Banken (siehe Kapitel 2.4.6) wurden diese Kontroll-MTPn je einmalig verwendet und dann verworfen.

2.4.6. Kultivierung und Zellyse für das Hochdurchsatz-Screening der AS-Variantenbanken

Von den Mutterplatten (siehe Kapitel 2.4.5) wurden im gefrorenen Zustand die Verschlussfolien entfernt, um eine Kontamination durch Tröpfchen zu vermeiden. Die Kryokulturen wurden bei RT aufgetaut (ca. 1 h) und anschließend die Klone in frische 384-Mulden-MTPn aus Polypropylen (781201, Greiner Bio-One) überimpft, die je 75 µl LB-Medium, ergänzt mit Kanamycin (50 µg/ml), Ampicillin (200 µg/ml) und IPTG (0,4 mM), enthielten. Hierfür wurden präparierte QReps-Stempel verwendet, denen die Spitzen in den Positionen B2, 4, 6, 8 und D2, 4, 6 und 8 fehlten. Die ausgelassenen Mulden wurden danach durch Stempeln mit dem WT (B2...B8) bzw. dem Wirtsstamm ohne AS-Gen (D2...D8) als interne Kontrollen beimpft (siehe Kapitel 2.4.5). Die Platten wurden für 24 h bei 30°C auf einem GIO-Schüttler mit 225 rpm inkubiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ in einem MTPn-Spektrophotometer (µQuant, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) gemessen.

Zur Lyse der Zellen wurden wie in Kapitel 2.4.4.3 beschrieben mit einer Mehrkanalpipette je 4 µl Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) in die Mulden pipettiert und für 5 min bei 500 rpm auf einem MTPn-Schüttler (MTS 2/4 digital, IKA-Werke, Staufen) geschüttelt. Anschließend wurde die MTP mit Verschlussfolie (Polyester, H770.1, Roth) abgeklebt, für ca. 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Für das Screening wurden die Verschlussfolie in gefrorenem Zustand entfernt (siehe oben), die Platten bei RT an der Luft aufgetaut und 45 min bei ca. 1900 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in die Screening-Reaktionen eingesetzt.

2.4.7. Kultivierung und Zellyse von ausgewählten Klonen, die Polymer-defiziente AS-Variante synthetisieren

Zur Überprüfung der Screening-Ergebnisse wurden von je 15 ausgewählten Klonen der AS-Variantenbanken 5H und 7/1 Vorkulturen aus den MTPn-Mutterplatten angelegt und ÜN inkubiert. Je 5 ml LB-Medium mit IPTG, Ampicillin und Kanamycin wurden mit diesen ÜNK angeimpft und erneut ÜN bei 30°C inkubiert. Je 4 ml der Bakteriensuspension wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml H₂O resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zusatz von 1 % Triton X-100 und Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (2.4.4.3 und 2.4.4.4). Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei ca. 16000 g abgetrennt.

2.5. Aufreinigung von His-AS-Fusionsproteinen

Für die Aufreinigung der His-AS-Fusionsproteine wurde das „ProBond™ Purification System Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen nach Herstellerangaben mit leichten Änderungen: Die Puffer wurden mit 20 mM (statt 50 mM) NaH_2PO_4 hergestellt. Es wurde zweimal mit Waschpuffer mit 20 mM Imidazol und zweimal mit 40 mM Imidazol gewaschen (statt viermal mit 20 mM Imidazol). Die erste Elution erfolgte mit 12 ml Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol. Anschließend folgte eine weitere Elution mit 8 ml Elutionspuffer mit 500 mM Imidazol. Das Eluat wurde jeweils in Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen und per SDS-PAGE analysiert.

Die Bindungskapazität des Nickel-Chelat-Harzes betrug ca. 1-5 mg Protein pro ml. Eine zu geringe Beladung kann die unspezifische Bindung von Proteinen fördern, eine Überladung führt dagegen zum Verlust von AS in den Waschrufen. Daher wurde zunächst die Gesamt-Protein-Konzentration einer Probe per Bradford-Methode (siehe Kapitel 2.6) bestimmt. Ferner erfolgte eine Abschätzung des AS-Anteils über Quantifizierung der AS-Bande per SDS-PAGE und Aufreinigungsvorversuche. Anhand der Ergebnisse wurde entschieden, zur Aufreinigung 2 ml des Säulenmaterials mit 2,5-5 mg der His-AS zu beladen (entspricht 2-4 ml des Zellextrakts nach der Lyse per French Press, siehe Kapitel 2.4.4.2).

Der Puffer der Elutionsfraktion mit der AS wurde gegen Aufbewahrungspuffer 1 (2.2.2.3) bzw. Aufbewahrungspuffer 2 (2.2.2.4) ausgetauscht. Der Austausch wurde mit Centriprep-Filtern mit Ultracel YM-50-Membran (Millipore, Schwalbach) durchgeführt. Die Elutionsfraktion wurde mit dem Aufbewahrungspuffer auf 14 ml aufgefüllt und für 45 min bei 1500 g und 4°C (Megafuge 2.0 RS, Rotor mit Ausschwingbechern, Thermo Scientific) zentrifugiert. Der Überstand im inneren Zylinder wurde verworfen, die am Röhrchenboden verbliebene Probenlösung wieder auf 14 ml aufgefüllt und erneut mit den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. An den letzten Durchgang schloss sich zur Konzentrierung der Probe noch ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt ohne ein vorheriges Auffüllen an. Das Endvolumen lag bei 1-3 ml.

2.6. Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Methode der Proteinmessung erfolgte nach Bradford [67]. Für die Messung wurde das „Quick Start™ Bradford Dye (1x)“ Reagenz (Bio-Rad) verwendet. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumin Standard Set“, Bio-Rad). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter Anpassung des Volumens für Halbmikro-Küvetten auf 750 µl 1x Dye.

2.7. Proteinanalyse mit denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAGE)

2.7.1. Gießen und Laden der Polyacrylamid-Gele

Zur Auftrennung von Proteingemischen im Polyacrylamid-Gel wurde die „Mini Protean 3 cell“ (Bio-Rad) verwendet. Die hierbei benutzten Glasplatten und Kämmen wurden vor dem Gebrauch sorgfältig mit Wasser und Ethanol gereinigt. Die Komponenten für das Trenn- und das Sammelgel sind unten stehend aufgelistet. Sie wurden in der angegebenen Reihenfolge unter Rühren in einem Becherglas zusammengemischt.

Zusammensetzung des Trenngels (12,5 %):

Acrylamid/Bis ¹⁾ (30 %) (37,5:1)	4,2 ml
4 x Lower Buffer (2.2.2.11)	2,54 ml
H ₂ O	2,34 ml
Glycerin (87 %)	0,86 ml
TEMED	22 µl
APS (10 %)	40 µl

Zusammensetzung des Sammelgels (4,0 %):

Acrylamid/Bis ¹⁾ (30 %) (37,5:1)	533 µl
4 x Lower Buffer (2.2.2.11)	1,0 ml
H ₂ O	2,47 ml
TEMED	10 µl
APS (10 %)	16 µl

¹⁾ Bis = N,N'-Methylen-bis-acrylamid.

Die fertige Gellösung für das Trenngel wurde bis ca. 1 cm unterhalb der Oberkante der kürzeren Glasplatte eingefüllt. Anschließend wurde mit deionisiertem Wasser überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde gründlich mit deionisiertem Wasser gespült, um mögliche verbleibende Reste der Gellösung zu entfernen. Die Gellösung für das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen und der Kamm eingesteckt. Nach der Polymerisation wurden die Gelplatten in die Laufkammer eingespannt und diese mit SDS-Laufpuffer befüllt.

2.7.2. Probenvorbereitung und Gellauf

Zur Vorbereitung wurden die Proteinlösungen mit 2x-Probenpuffer (*Cracking*-Puffer, engl. *cracking* = das Knacken, Sigma [68]) versetzt, für 5 min bei 95°C im Heizblock inkubiert und auf Eis abgekühlt. Zum Auftragen wurde wieder auf 56°C erwärmt. Bei Vorhandensein von Imidazol in den Proben wurde maximal auf 37°C erhitzt. Die Taschen (15er-Kamm) wurden üblicherweise mit 3 bis 10 µl Probe beladen.

Als Größenstandards wurden die Marker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) sowie der „Low Molecular Weight (LMW) Marker“ (GE Healthcare) in je einer Tasche mit aufgetragen. Zur quantitativen Auswertung diente eine mit *Cracking*-Puffer versetzte Verdünnungsreihe von BSA („Bovine Serum Albumin Standard Set“, Bio-Rad). Die Elektrophorese wurde zunächst für ca. 15-20 min bei 70 V durchgeführt. Sobald das Bromphenolblau das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Beim Erreichen der Unterkante nach ca. 75 min wurde die Elektrophorese gestoppt, das Gel ausgebaut und sofort in Plastikschaalen gefärbt.

2.7.3. Färben und Entfärben von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Beim Ausbau des Gels wurde das Sammelgel per Skalpell vom Trenngel abgetrennt. Das Sammelgel wurde in eine 10x10 cm große Plastikschaale überführt und mit der Coomassie-Färbelösung (siehe Kapitel 2.2.2.5) überschichtet. Die Färbung wurde für ca. 1 h bei RT unter leichtem, horizontalem Schütteln durchgeführt. Alternativ wurde auch ÜN gefärbt. Zum Entfärben wurde zunächst die Färbelösung abgegossen und dann das Gel mit Entfärber I überschichtet (siehe Kapitel 2.2.2.7). Nach Färbung für 1 h wurde etwa 30 min entfärbt, bei ÜN-Färbung ca. 1-2 h entfärbt. Anschließend wurde der Entfärber I dekantiert und durch Entfärber II (siehe Kapitel 2.2.2.8) ersetzt. Die Entfärbung wurde bis zur gewünschten Helligkeit des Gelhintergrunds fortgesetzt.

2.7.4. His-tag-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Für die Färbung wurde der „InVision™ His-tag In-gel Stain“ (Invitrogen) benutzt. Die Durchführung erfolgte nach der Mikrowellenprozedur gemäß Herstellerangaben. Eine Anpassung der Inkubationszeit in der Mikrowelle auf stets 22 s erfolgte aufgrund abweichender Geldicke (hier 0,75 statt 1,0 mm) und Mikrowellenleistung (hier 600 statt 1000 Watt, Powerwave, Brother). Die Sichtbarmachung der Proteinbanden fand auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm statt und wurde mit Hilfe einer Geldokumentation (BioPrint/Vilber Lourmat, Eberhardzell) dokumentiert. Die Belichtungsdauer betrug 6-8 s.

2.7.5. Dokumentation, Analyse und Lagerung von Polyacrylamid-Gelen

Das Gel wurde auf einem CanoScan-9950F-Scanner im Auflicht mit der Software Adobe Photoshop Elements 2.0 (Adobe) eingescannt. Sämtliche Parameter zur Bildeinstellung waren dabei auf „Aus“ oder „Ohne“. Das als tiff-Datei vorliegende Bild wurde mit der AIDA-Software (siehe Kapitel 2.9) ausgewertet.

Zum Haltbarmachen und Trocknen der Polyacrylamid-Gele wurde der Entfärber II durch eine Aufbewahrungslösung (siehe Kapitel 2.2.2.9) ersetzt. Nach 1-2 h Inkubation unter Schütteln wurde das Gel zwischen zwei Cellophanfolien („Precut Cellophan Sheets, GE Healthcare) gelegt und für 3-4 h im Geltrockner (Easy Breeze Gel Dryer, Hoefer Instruments, San Francisco, USA) getrocknet.

2.7.6. Bestimmung der Reinheit aufgereinigter AS über SDS-PAGE

Von den aufgereinigten AS-Proben (jeweils ca. 1 mg/ml AS) wurden zweimal 30 µl mit jeweils 30 µl *Cracking*-Puffer versetzt. Von diesen Verdünnungen wurden in einem zweiten Schritt je 20 µl mit 60 µl *Cracking*-Puffer gemischt. Je 10 µl der vier so hergestellten Proteinlösungen wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben aufgetrennt. Zur Berechnung der Reinheit der AS wurden in Bilddateien der Gele alle sichtbaren Proteinbanden mit Hilfe des BSA-Standards unter Zuhilfenahme der Software AIDA quantifiziert (2.9).

2.8. Inkubation von Saccharose und Saccharose-Analoga mit AS

2.8.1. Standardbedingungen zur Bestimmung der AS-Aktivität

Die spezifische Aktivität der Amylosucrase wurde standardmäßig bei einer Sac-Konzentration von 146 mM und 0,1 g/l Glycogen (für biochemische Zwecke, 4202 Merck, Darmstadt) bestimmt. Als Reaktionspuffer diente 1x PBS. Die Reaktion wurde durch Zupipettieren einer AS-Enzymlösung zu den auf 30°C vorinkubierten restlichen Reaktionskomponenten gestartet. Das Gesamtvolumen betrug maximal 1,5 ml. Bei hoher Aktivität der Proben wurde das Reaktionsvolumen zum Teil verringert, um Enzym zu sparen. Wenn die Enzymlösung mehr als 20 % (v/v) am Gesamtvolumen betrug, wurde sie auf 30°C vorinkubiert, um die Reaktionstemperatur bei Zugabe nicht zu stark abzusenken. Die Reaktion wurde für 15 min bei 30°C im Thermomixer inkubiert, anschließend für 5 min bei 100°C im Wasserbad hitzeinaktiviert und sofort im Eisbad abgekühlt. Die Konzentration von Glc und Fru wurde photometrisch mit einem gekoppelten enzymatischen Test (2.8.2) bestimmt. Eine Enzym-Einheit (U) wurde definiert als die Menge AS, die in 1 min die Freisetzung von 1 µmol Fru unter den beschriebenen Bedingungen katalysiert.

2.8.2. Enzymatische Konzentrationsbestimmung von Glucose und Fructose

Der Gehalt an Glc und Fru in einem Reaktionsansatz wurde standardmäßig mit dem „D-Glucose/D-Fructose Kit“ (r-biopharm AG, Darmstadt) bestimmt. Der Nachweis wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, das Volumen aber für den Einsatz in Halbmikro-Küvetten entsprechend verkleinert. Die Schichtdicke betrug in Küvetten stets einen Zentimeter. Für Messungen in MTPn wurde über das Volumen und die Muldenform die Schichtdicke berechnet und zusätzlich per Lineal überprüft.

Nach Hitzeinaktivierung der AS für 5 min bei 100°C und Abkühlen auf Eis wurden die Proben für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden maximal 600 µl des Überstandes mit 300 µl TRA-Gemisch aus dem „Kit“ (Triethanolaminpuffer, pH ca. 7,6, NADP, ATP, MgSO₄) in Halbmikro-Küvetten mit einem Plastikspatel durchmischt und die Hintergrund-Absorption bei 340 nm im Photometer (UV-2401PC, Shimadzu, Kyoto, Japan) vermessen. Bei Messungen mit weniger als 600 µl Probe wurde das restliche Volumen mit ddH₂O aufgefüllt. Der dadurch entstehende Verdünnungsfaktor wurde in die anschließende Berechnung der Konzentrationen mit einbezogen. Als nächstes wurden 6 µl der Enzymsuspension 2 (HK [ca. 285 mU/µl], G6P-DH [ca. 140 mU/µl]) zupipettiert, gemischt und für mind. 5 min (oder bis keine weitere Steigerung der Absorption auftrat) bei RT inkubiert. Nach der 2. Messung der Absorption (Glc) wurden 6 µl der Enzymsuspension 3 (PGI [ca. 700 mU/µl]) zupipettiert und wie oben weiter verfahren (3. Messung, Glc + Fru). Allgemein wurde bei den Konzentrationsbestimmungen darauf geachtet, durch geeignete Vorverdünnungen mit ddH₂O eine Absorption von 1,0 möglichst nicht zu überschreiten.

Bei Vorversuchen wurde die Konzentrationsbestimmung teilweise im 384-Mulden-MTPn-Format durchgeführt. Hierfür wurden die Volumina der Reaktionskomponenten auf ein Gesamtvolumen von 100 µl angepasst. Das Mischen erfolgte durch wiederholtes Aufziehen und Abgeben mit einer Mehrkanalpipette. Die UV-photometrische Messung wurde in einem Mikrotiterplatten Spektrophotometer (µQuant, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA) durchgeführt.

2.8.3. Enzymatische Konzentrationsbestimmung von Saccharose, Glucose und Fructose

Der Gehalt an Sac, Glc und Fru in einem Reaktionsansatz wurde mit dem „Saccharose/D-Glucose/D-Fructose Kit“ (r-biopharm AG) bestimmt. Dieser Test entspricht für Glc und Fru dem Nachweis-Test aus Kapitel 2.8.2. Der Gehalt an Sac wird über die Konzentration freier Glc vor und nach der enzymatischen Hydrolyse von Sac bestimmt. Die Hydrolyse wird durch das Enzym β-Fructosidase katalysiert.

Der Nachweis wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, das Volumen aber für den Einsatz in Halbmikro-Küvetten entsprechend verringert. Die Proben wurden bei Bedarf mit ddH₂O soweit verdünnt, dass die Absorption unter 1,0 blieb.

2.8.4. Test auf Umsatz von Saccharose-Analoga durch WT-AS und Varianten

Nachfolgend sind die Komponenten für die Umsatzreaktion von Sac-Analoga mit WT-AS und den Tyr147-Varianten angegeben. Um Pipettierfehler gering zu halten, wurde zuerst für jede Reaktion ein Vielfaches aller Komponenten, ausgenommen die Enzymlösungen, als Mastermix angesetzt und dann in Reaktionsgefäße aliquotiert.

Zusammensetzung der Umsatzreaktion für Allo- und Mannosaccharose mit AS:

AS, gereinigt	12,5	µl	50 % (v/v)
10x PBS ohne NaCl	2,5	µl	
NaCl [1 M]	1,625	µl	
Substrat [5 mM] ¹⁾	1,25	µl	0,25 mM Endkonzentration
Glycogen [100 g/l]	0,125	µl	0,5 g/l Endkonzentration
ddH ₂ O	7,0	µl	

¹⁾ Stammlösungen aus Tab. 23 (Allosaccharose Ch. 0002), verdünnt mit ddH₂O

Zusammensetzung der Umsatz-Reaktion für Xylo- und Galactosaccharose mit AS:

AS, gereinigt	12,5	µl	50 % (v/v)
10x PBS ohne NaCl	2,5	µl	
NaCl [1 M]	1,625	µl	
Substrat [5 mM] ¹⁾	2,0	µl	0,4 mM Endkonzentration
Glycogen [100 g/l]	0,125	µl	0,5 g/l Endkonzentration
ddH ₂ O	6,25	µl	

¹⁾ Stammlösungen aus Tab. 23, verdünnt mit ddH₂O.

Als Hintergrund wurde ein Reaktionsansatz mit Aufbewahrungspuffer 1 anstelle der AS mitgeführt. Alle Ansätze wurden in 0,5-ml-Reaktionsgefäßen für 42 h bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Zur Analyse wurden je 3 µl der Reaktion unverdünnt auf eine DC-Platte aufgetragen und wie unter 2.8.11 beschrieben entwickelt.

2.8.5. Hochdurchsatz-Screening auf Allosaccharose-Umsatz mit Banken von AS-Varianten

Für den Test auf Umsatz von Allosaccharose (Allosac) mit Banken von Varianten wurde nachstehendes Reaktionsgemisch verwendet. Eine 1600-fache Menge davon wurde als Mastermix frisch angesetzt und je 5 µl pro Mulde per Mehrkanalpipette in vier MTPn (Typ 781186, Greiner Bio-One) vorgelegt.

Zusammensetzung des Mastermix der Allosaccharose-Reaktion:

		Endkonzentration in der MTPn-Mulde
PBS, 25x	1,08	µl
Allosaccharose (Ch. 7036) [1,9 M] ¹⁾	0,10	µl
Chloramphenicol [50 mg/ml]	0,027	µl
ddH ₂ O	3,8	µl

¹⁾ Stammlösungen aus Tab. 23.

Per Pipettier-Roboter (Evolution™ P3 Precision Pipetting Platform, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) wurden je 22 µl Lysat (Präparation siehe Kapitel 2.4.6) in die Mulden pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Der Pipettier-Roboter verfügte nur über 96 Nadeln und musste deshalb eine 384-Mulden-MTP in vier Durchgängen (Quadranten) befüllen. Zwischen den einzelnen Durchgängen und nach einem MTPn-Wechsel wurden die Spitzen der Nadeln je dreimal mit ddH₂O gespült. Die MTPn wurden sorgfältig mit Klebefolie H770.1, Roth) abgeklebt und für zwei Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation wurde die Folie entfernt und die Messung der Fruktosekonzentration durchgeführt. Dazu wurde in jede Mulde ein Mix aus 13,5 µl TRA-Puffer, 0,27 µl Enzymsuspension 2 (siehe Kapitel 2.8.2) und 0,03 µl H₂O per Mehrkanal-Pipette pipettiert und für 5-10 min bei 600 rpm auf einem MTPn-Schüttler (MTS 2/4 digital, IKA)

gemischt. Anschließend wurde die Absorption bei 340 nm im MTPn-Spektrophotometer gemessen (Hintergrund inklusive Glc). Im zweiten Schritt wurden 0,27 µl Enzymsuspension 3 (siehe Kapitel 2.8.2) und 4,73 µl H₂O als Gemisch zupipettiert und wie beschrieben gemischt und vermessen (Fru).

2.8.6. Screening auf Inhibition der Amylosebildung

Für den Test auf Sac-Aktivität und Amylosebildung mit Banken von Varianten wurden in 384-Mulden-MTPn (781101, Greiner Bio-One) je Mulde 37 µl frisch angesetzter Mastermix (siehe unten) per Pipettier-Roboter (siehe 2.8.5) vorgelegt.

Zusammensetzung des Mastermix der Saccharose/Polymer-Reaktion:

		Endkonzentration in der MTPn-Mulde
Saccharose [1,46 M]	1,44 µl	50 mM
Glycogen [10 g/l]	0,42 µl	0,1 g/l
TRA-Puffer (2.8.2)	14,0 µl	
Enzymsuspension 2 (2.8.2)	0,28 µl	
Enzymsuspension 3 (2.8.2)	0,28 µl	
ddH ₂ O	20,6 µl	

Mit dem Pipettier-Roboter wurden anschließend je 5 µl Lysats (Präparation siehe Kapitel 2.4.6) in die einzelnen Mulden pipettiert (vier Quadranten á 96 Mulden) und dreimal durch Aufziehen und Entleeren gemischt. Nach 15, 25, 35 und 45 min Inkubation bei RT wurde jeweils der Sac-Umsatz über die Absorption bei 340 nm (gegen Luft) im MTPn-Spektrophotometer gemessen. Nach 50 min wurden 60 µl Iodlösung (3 mM I₂, 50 mM KI, 10 mM HCl) per Mehrkanal-Pipette zupipettiert und nach weiteren 10 min Inkubation bei RT die Absorption bei 570 nm (gegen Luft) gemessen. Anschließend wurde die MTP zur Dokumentation eingescannt (wie in Kapitel 2.7.5 beschrieben, aber als jpeg-Datei).

2.8.7. Nachweis von Amylose durch Färbung mit Iod

Als einfacher, qualitativer Nachweis zur Expression und Glucosyltransferase-Aktivität der AS *in vivo* wurden die *E.-coli*-Stämme auf LB-Agar angezogen, dem steril 5 % (w/v) Sac zugesetzt worden war. Bei Bakterienstämmen/Plasmiden, die zur Expression des AS-Gens induziert werden mussten, wurde zusätzlich noch IPTG [0,4 mM] ins Medium gegeben. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C. Die Detektion von anfärbbarem Polymer erfolgte durch kristallines I₂, welches in fester Form in den Deckel der umgedrehten Petrischalen gestreut wurde. Zur besseren und länger anhaltenden Anfärbung wurden die Petrischalen mit Parafilm abgedichtet.

Ein einfacher, qualitativer Nachweis *in vitro* wurde per Iodfärbung der Amylose in Lösung zur Überprüfung der potenziell Polymer-negativen AS-Varianten durchgeführt.

Zusammensetzung der Reaktion:

Zellextrakt, OD ₆₀₀ 10-15 (3.3.4.1)	100 µl	20 % (v/v)
PBS, 25x	20 µl	
Saccharose [1,46 M]	150 µl	146 mM Endkonzentration
ddH ₂ O	330 µl	

Nach 24 h Inkubation bei 30°C wurden 10 µl des Reaktionsansatzes mit 20 µl H₂O und 20 µl Iodlösung (2.8.6) in MTPn-Mulden gemischt. Anhand entstehender Blaufärbung wurde die Fähigkeit zur Polymerbildung detektiert.

2.8.8. Aktivitätstests und Produktmuster ausgewählter Polymer-defizienter Varianten

Die Aktivitäten und Produktmuster einzelner, ausgewählter Varianten der Banken 5H und 7/1 wurden unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. Die Kultivierung und Lyse der Proben wurde wie in Kapitel 2.4.3 und 2.4.4.2 (French Press) durchgeführt. Die Reinigung erfolgte wie in Kapitel 2.5 angegeben.

2.8.8.1. Standard-Aktivitätstests mit verschiedenen Akzeptoren

Die Aktivität der Varianten wurde mit Sac als einzigem Substrat [146 mM] sowie mit Arb, α-MeG1 [je 146 mM] bzw. Glycogen [0,1 g/l] als Akzeptoren unter Standard-Bedingungen gemessen. Die jeweiligen Protein-Konzentrationen (siehe Tab. 14) wurden unter verschiedenen Bedingungen gleich bleibend verwendet.

Tab. 14. Protein-Konzentration von WT-AS und Polymer-negativen Varianten in Aktivitätstests

AS (-Variante)	Proteinmenge [µg/ml] in Aktivitätstests
WT	18,0
V05	15,5
V07	17,3
V16	18,0
V17	19,2
V19	19,8
V20	16,2
V28	19,8

2.8.8.2. Produktmuster mit verschiedenen Donoren und Akzeptoren

In Langzeit-Umsätzen wurden die Produkte mit Sac als Donor-Substrat und Arb bzw. α-MeG1 als Akzeptor einerseits sowie mit Glc2 bzw. Glc3 als Donor-Substrat andererseits untersucht. Tab. 15 zeigt die jeweils verwendeten Protein-Konzentrationen der einzelnen Varianten.

Tab. 15. Protein-Konzentration von WT-AS und Varianten in Langzeit-Umsätzen

AS (-Variante)	Proteinkonzentration [µg/ml] in Langzeit-Umsätzen	
	Arb/α-MeG1	Glc2/Glc3
WT	36,0	180
V05	31,0	155
V07	34,6	173
V16	36,0	180
V17	38,4	192
V19	39,6	198
V20	32,4	162
V28	39,6	198

2.8.9. Hydrolyse von Saccharose-Analoga zur Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der von der AG Buchholz synthetisierten Sac-Analoga wurde durch saure Hydrolyse mit anschließender photometrischer Bestimmung der freien Fru nach der Methode in Kapitel 2.8.2 ermittelt. Ein kleines Volumen einer Stammlösung wurde in 1 N HCl über Nacht bei 60°C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Probe für 5 min bei 100°C inkubiert (persönliche Mitteilung R. Beine). Eine 1:400 Verdünnung (entspricht ca. 1-4 mM hydrolysiertes Analogon) der Reaktion wurde per DC auf Vollständigkeit der Hydrolyse überprüft.

2.8.10. Konzentrationsbestimmung reduzierender Zucker

Zu vermessende Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit dem DNS-Reagenz vermischt und für 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf RT wurde bei 540 nm die Absorption gemessen. Die Berechnung unbekannter Konzentrationen erfolgte durch Zuhilfenahme einer selbst erstellten Fru-Eichkurve.

DNS-Reagenz:

3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS)	2,0 g	1 % (w/v)
Kaliumnatriumtartrat	60,0 g	30 % (w/v)
NaOH	3,2 g	
ddH ₂ O	ad 200 ml	

2.8.11. Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Analyse der Produkte von Amylosucrase-Reaktionen wurden diese mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt und mit Hilfe von N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid sichtbar gemacht [64]. Die Auftrennung erfolgte auf DC-Platten mit einer Konzentrierungszone im Auftragsbereich der Proben (Silicagel 60 F254, Merck, Darmstadt). Je nach Anzahl aufzutragender Proben variierte das Probenvolumen von 0,75 µl bis 3,0 µl. Nach Hitzeinaktivierung des AS-Reaktionsansatzes wurden die Proben 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und bei Bedarf mit ddH₂O verdünnt. Als Marker für die Mobilität der Produkte dienten Gemische bekannter Zucker [2-5 mM]. Die anschließende Entwicklung des Chromatogramms (siehe Kapitel 2.2.2.14) in der DC-Kammer wurde ein- bis dreimal für 45-90 min durchgeführt, wobei die DC-Platten zwischen zwei Entwicklungen mit einem Haartrockner getrocknet wurden.

Zum Sichtbarmachen der Zucker wurden die DC-Platten für 3-6 s in die Färbelösung getaucht (siehe Kapitel 2.2.2.15), mit einem Haartrockner getrocknet und für 15 min bei 120°C inkubiert. Das in Methanol mit 3 % Schwefelsäure gelöste farblose Nachweis-Reagenz N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid reagiert mit Sacchariden, sowie Aminosackern, Cyclitolen und Ascorbinsäure zu einem Farbstoff [64]. Zur weiteren Auswertung mit der AIDA-Software wurden die DC-Platten sofort danach eingescannt (siehe Kapitel 2.7.5).

2.8.12. Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Verdünnte Aliquots von Reaktionen mit Arbutin (3.1.3.3.2) wurden mit Hilfe eines Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographen (Shimadzu LC10AD) mit einer SC Lichrosphere-100-RP8-5-µm-Säule (Länge: 125 mm, Innendurchmesser: 4,6 mm) (Bischoff, Leonberg, Deutschland) analysiert. Die Proben wurden mit ddH₂O 1:25 bzw. 1:50 (v/v) verdünnt. Wasser diente als Eluent. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.

Die Verbindungen wurden mit einem Dioden-Array-Detektor nachgewiesen und über die Peakflächen quantifiziert, ausgehend von der Annahme, dass Arbutin und seine Glucosylierungsprodukte den gleichen Extinktionskoeffizienten aufweisen.

2.8.13. Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS)

Diese Versuche wurden freundlicherweise von Dr. Heinrich Steinmetz durchgeführt. Die Analyse wurde per Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie in Verbindung mit einer UV-Detektion gemacht. Die verwendeten Parameter der Untersuchung sind nachstehend aufgeführt.

HPLC – Agilent 1100 LC System

Säule	125 x 2 mm Nucleodur 120-5-C18 (Macherey & Nagel)
Fließgeschwindigkeit	0,3 mL/min
Gradient	100 % A ^{20min} → 100 % B ^{10 min} → 100 % B
Lösungsmittel A	Wasser + 5mM Ammoniumacetat pH 5,5
Lösungsmittel B	5% Acetonitril, 95 % Wasser + 5 mM Ammoniumacetat pH 5,5
Injektionsvolumen	5 µL
Detektion	UV-DAD
Massen-Spektrometer	– PE Sciex API 2000 ausgestattet mit Turbo Spray (ESI Modus)
MS Methode	Positiv / negativ Full scan
Massenbereich	100 AMU – 1000 AMU
Step size	0,1 AMU
Settling time	700 ms
Scan time	1,5 sec
Temperatur	350°C

2.9. Software

Auswertungen von Banden- bzw. Spotintensitäten in Bilddateien von Elektrophoresegelelen und DCs wurden mit AIDA 4.15.025 (Advanced Image Data Analyzer) (raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt) vorgenommen.

Alle Abbildungen von Proteinstrukturen sowie Berechnungen von räumlichen Interferenzen bei den Strukturmodellen der Polymer-negativen Varianten wurden mit dem Programm „UCSF Chimera“ Version 1, Build 2470 (University of California at San Francisco, USA) erstellt [69]. Die Parameter für die Berechnung sterischer Interferenzen zwischen Atomen in Strukturmodellen wurden auf den Standardeinstellungen (*default clash criteria*) belassen.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe des Textverarbeitungsprogramms „Microsoft Word 2003“ (Microsoft) erstellt. Die Auswertung und Darstellung von Messergebnissen erfolgte mit „Microsoft Excel 2003“ (Microsoft, Redmond, Seattle, USA).

3. ERGEBNISSE

3.1. Klonierung und Charakterisierung von Amylosucrase aus *N. polysaccharea*

Für die Charakterisierung von AS bezüglich der Donor- sowie der Akzeptor-Substratspezifität wurde das AS-Gen isoliert und in verschiedenen Expressionsvektoren kloniert. Im Verlauf der Arbeit wurden drei unterschiedliche Plasmid-Konstrukte erstellt, die im Folgenden beschrieben werden.

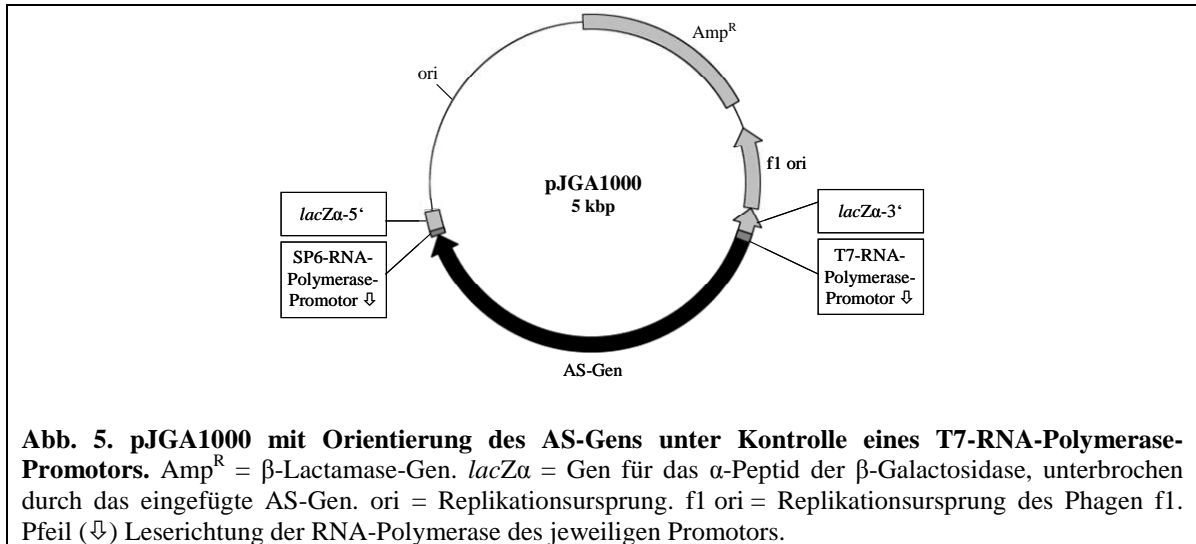
3.1.1. Klonierung verschiedener Formen des AS-Gens in verschiedene Expressionsvektoren

3.1.1.1. Klonierung des Wildtyp-AS-Gens im Vektor pGEM-T Easy

Per PCR mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase mit niedriger Fehlerrate (*Pfu*-DNA-Polymerase) wurde das WT-AS-Gen inklusive ca. 60 Basenpaare 5'-untranslatierter Sequenz aus dem Genom von *N. polysaccharea* amplifiziert und nach Anfügen je eines 3'-Adenosins (A-Überhang, siehe Kapitel 2.3.11) an das PCR-Produkt in den linearisierten Vektor pGEM-T Easy, der einen T-Überhang besitzt, ligiert. Der Vektor enthält Promotoren für die RNA-Polymerasen der Bacteriophagen T7 und SP6, die einen Polylinker (Multiple cloning site, MCS) flankieren, welcher in der für das α -Peptid der β -Galactosidase codierenden Sequenz liegt. Die Inaktivierung dieses Gens durch Insertion erlaubt eine rasche Identifizierung rekombinanter Klone durch Blau-Weiß-Screening, sofern der Wirtstamm eine *lacZ* Δ M15-Mutation trägt. Das α -Peptid selbst ist enzymatisch inaktiv, vermittelt aber die Tetramerbildung des ebenfalls inaktiven ω -Peptids, codiert vom *lacZ* Δ M15-Gen des Wirtsbakteriums, wodurch eine aktive tetramere β -Galactosidase entsteht (α -Komplementation). Die aktive β -Galactosidase setzt das farblose X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-galactosid) in Galactose (Gal) und 5-Brom-4-Chlorindoxyl um, welches der Luftsauerstoff zu einem blauen Indigo-Farbstoff oxidiert. Wird die für das α -Peptid codierende Sequenz durch Insertion von DNA unterbrochen, geht die Fähigkeit zur α -Komplementation und damit zur Bildung von enzymatisch aktiver β -Galactosidase verloren. Klone mit insertierter DNA erscheinen daher weiß und können selektiert werden (siehe Kapitel 2.3.14.3). Eine β -Lactamase verleiht dem *E. coli*-Stamm eine Resistenz gegen Ampicillin.

Durch die Verwendung von PCR-Produkten mit einem 3'-Adenosin im Überhang (siehe oben) wird die Ligation in den Vektor ermöglicht. Das insertierte Fragment kann je nach Orientierung entweder unter der Kontrolle des T7-Promoters oder unter der Kontrolle des SP6-Promoters vorliegen. Die für die primäre Herstellung von PCR-Produkten des WT-Gens genutzte *Pfu*-DNA-Polymerase erzeugt aufgrund ihrer 3' \Rightarrow 5' Exonuklease-Aktivität keine Überhänge an den PCR-Fragmenten. Deshalb wurde das 3'-Adenosin in einer nachfolgenden Reaktion mit einer *Taq*-DNA-Polymerase angefügt, die die Fähigkeit besitzt, template-unabhängig ein Adenosin an ein PCR-Produkt anzufügen.

Die erhaltenen Klone wurden mittels Restriktionsanalysen untersucht, um die Orientierung des Inserts zu ermitteln. Die Sequenzierung je eines Plasmids pro möglicher Orientierung ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit der publizierten WT-Sequenz für die SP6- und einen Fehler für die T7-Orientierung. Die Sequenzierung eines weiteren Plasmids zeigte auch hier das korrekte Ergebnis. Das codierte Genprodukt war 636 AAn lang. Letzteres Plasmid wurde pJGA1000 genannt (siehe Abb. 5).



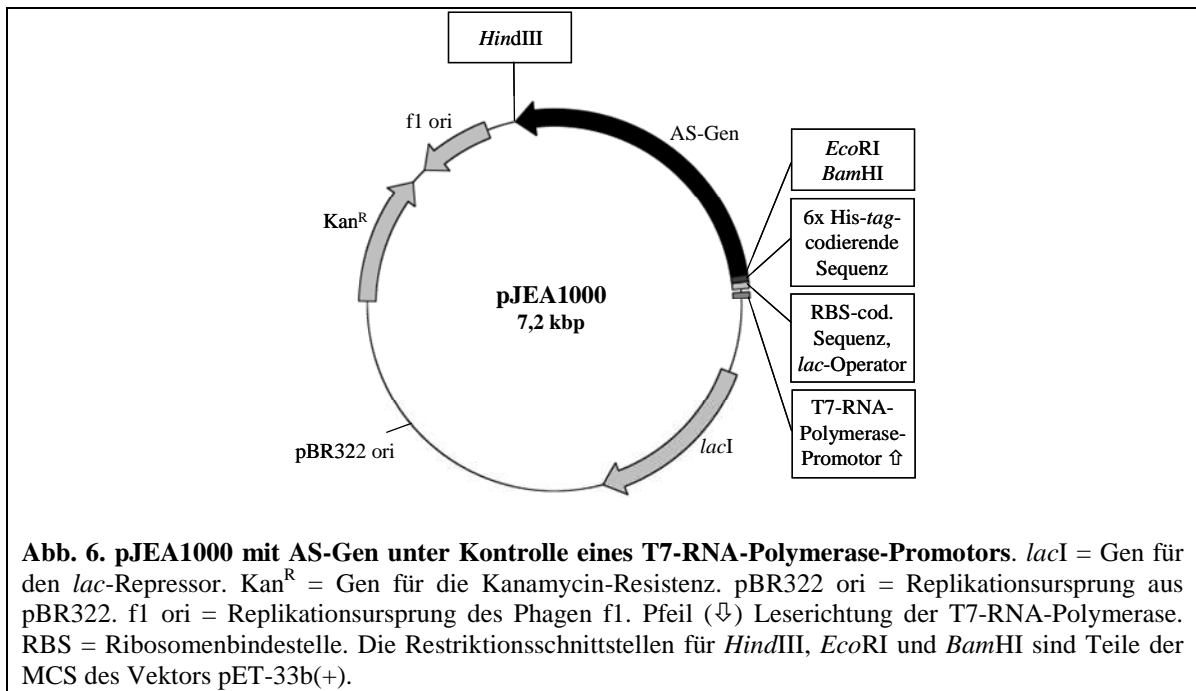
3.1.1.2. Klonierung eines His-tag-AS-Gens im Vektor pET-33b(+)

Eine 6x-His-Sequenz (His-tag) am N- bzw. am C-terminalen Ende eines Proteins gestattet oft eine einfache Aufreinigung über eine Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie und zusätzlich den Nachweis des Zielproteins in Polyacrylamid-Gelen über eine spezifische His-tag-Färbung. Die in dieser Arbeit erzeugten AS-Fusionsproteine verfügen über vektorseitig codierte N-terminale 6x-His-tags, d. h. es wurden Fusionen zwischen Leserastern von Vektor und Zielgen erzeugt.

Zur angestrebten Hochexpression des AS-Gens wurde der Vektor pET-33b(+) gewählt. Das T7-basierende pET/BL21*(DE3)-Transkriptions-/Translationsystem wurde bereits erfolgreich für eine hohe Proteinproduktion der Glycosyltransferase R aus *Streptococcus oralis* eingesetzt [70] und fand in 2003 bei über 90 % der rekombinanten Proteinpräparationen für die Proteindatenbank (PDB) Verwendung [71].

Der Vektor verfügt über einen T7-Promotor in Kombination mit einer *lac*-Operator-Sequenz (T7lac-Promotor/Operator). Durch einen an die Operator-Sequenz gebundenen *lac*-Repressor (*lacI*) kann die Transkription reprimiert werden, die Zugabe eines geeigneten Induktors wie IPTG hebt diese Repression wieder auf. Zudem sind das für den Repressor codierende *lacI*-Gen mit seinem natürlichen Promotor und ein Kanamycin-Resistenzgen auf dem Vektor codiert (siehe Abb. 6). Die RBS stammt vom Gen des Haupt-Hüllproteins des Phagen T7.

Dem N-terminalen 6x-His-tag des Translationsprodukts folgt die Erkennungssequenz für die Protease Thrombin zur möglichen Abspaltung des His-tags vom Protein.



Mittels entsprechend konzipierter Primer wurden in einer PCR die Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* (5': im ORF) und *HindIII* (3': hinter dem ORF des AS-Gens) eingefügt (2.4.2.3.1). PCR-Produkt und Vektor pET-33b(+) wurden mit diesem Enzympaar geschnitten, der Vektor zusätzlich noch dephosphoryliert. Um eine ungewollte Religation oder die Dimerbildung geöffneter Vektoren/Plasmide zu verhindern, wurde standardmäßig eine Dephosphorylierung mit dem Enzym SAP durchgeführt. Dieses katalysiert die Abspaltung des 5'-Phosphatrestes der DNA. Insbesondere beim Verbleib des ausgeschnittenen Vektor-Fragments im Reaktionsansatz ist dies von Vorteil, um eine ungewollte Rückligation zu verhindern. Geschnittene und aufgereinigte Insertions-DNA und Vektor-DNA wurden in eine Ligationsreaktion eingesetzt, mit der kompetente *E. coli*-Zellen von XL10-Gold und BL21*(DE3) transformiert wurden. Die Sequenzierung je eines Plasmids aus den erhaltenen Klonen ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit der inserierten WT-Sequenz. Das erzeugte Plasmid wurde pJEA100 genannt.

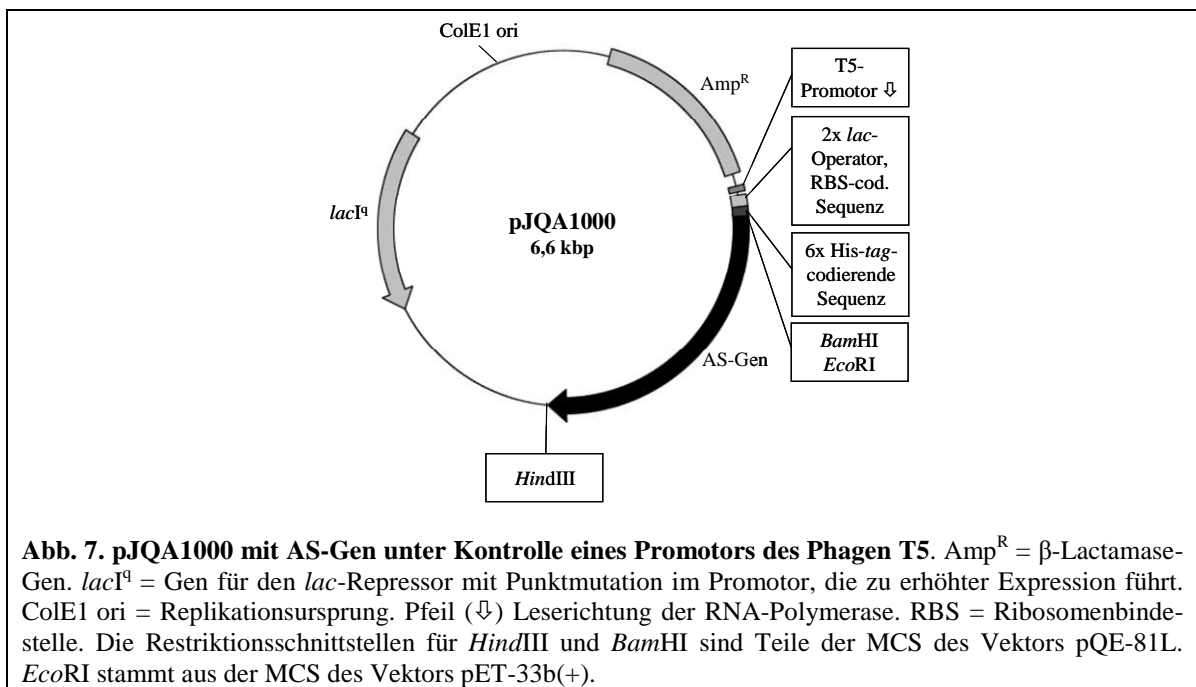
Das Translationsprodukt des im korrekten Leseraster in den Polylinker klonierten AS-Gens ist N-terminal um zehn AAn gegenüber dem WT-Enzym verkürzt (Teil einer putativen Signal-Sequenz [30]). Die AAn 11 und 12 sind durch die neu geschaffene *EcoRI*-Erkennungssequenz geändert (siehe Abb. 8 in Kapitel 3.1.1.3). Zusammen mit den N-terminal vektorseitig codierten AAn war das gesamte Genprodukt 665 AAn lang.

Die Konstruktion der Varianten mit einem Austausch der AA Tyr147 (Kapitel 3.2.2) sollte unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *DraI* und *SgrAI* erfolgen, die das entsprechende Codon in geringem Abstand flankieren (ca. 30 bzw. 150 bp). Für die Nutzung der *SgrAI*-Erkennungssequenz musste deshalb zunächst die einzige im Vektor pET-33b(+) vorhandene Erkennungssequenz entfernt werden. Diese Sequenz liegt in keiner essenziellen Region des Vektors. Die durch den Verdau von pET-33b(+) mit der Restriktionsendonuklease *SgrAI* erzeugten überstehenden einzelsträngigen 5'-Enden wurden zum Doppelstrang aufgefüllt (siehe Kapitel 2.3.12) und nachfolgend der Vektor durch Ligation der aufgefüllten Enden rezirkularisiert. Nach Transformation des *E. coli*-Stamms XL10-Gold mit dem Ligationsansatz und anschließender Plasmid-DNA-Präparation wurde per Restriktionsverdau mit dem Enzym *SgrAI* die erfolgreiche Entfernung der Schnittstelle bestätigt. Die neu erzeugte Vektor-Variante wurde pET-33b(+)S genannt. Mittels Restriktion (*EcoRI/HindIII*) und Ligation wurde das AS-Gen aus pJEA100 in den gleichermaßen geschnittenen und dephosphorylierten Vektor

pET-33b(+)_S eingefügt. Das erzeugte Plasmid wurde pJEA1000 genannt. Es unterscheidet sich von pJEA100 nur durch die fehlende *SgrAI*-Schnittstelle in der Vektor-Sequenz. Durch die so geschaffene Möglichkeit zur Nutzung der Schnittstelle im AS-Gen konnte bei der Mutagenese zur Erzeugung der Tyr147-Varianten die Länge des auszutauschenden Segments auf ca. 180 bp begrenzt werden. Als Wirtsstamm zur Expression diente für beide Plasmide der *E.-coli*-Wirtsstamm BL21*(DE3).

3.1.1.3. Klonierung eines His-tag-AS-Gens im Vektor pQE-81L

Der für eine effiziente Expression des AS-Gens im Plasmid pJEA1000 notwendige Stamm BL21*(DE3) kann nicht durch Elektroporation, also mit höchster Effizienz transformiert werden, wie sie für die Herstellung großer Banken statistischer Varianten der Amylosucrase benötigt wird (siehe Kapitel 3.2.4.4). Zellen höchster Kompetenz, wie ElectroTen-Blue besaßen kein Gen für die T7-RNA-Polymerase. Deshalb wurde versucht, ein Plasmid-Konstrukt zu erzeugen, das eine effiziente Expression in ElectroTen-Blue ermöglichte.



Das Plasmid pJEA1000 (siehe Kapitel 3.1.1.2) diente als AS-Gen-Donor für die Erzeugung eines solchen Plasmid-Konstrukts über Restriktion (*Bam*HI/*Hind*III) und Ligation in die MCS des Vektors pQE-81L. Der Vektor trägt einen Promotor des Phagen T5, der von der *E.-coli*-eigenen RNA-Polymerase erkannt wird, in 3'-Richtung gefolgt von zwei *lac*-Operatoren, einer für eine synthetische Ribosomenbindestelle codierenden Sequenz und der MCS. Repression und Induktion erfolgen dementsprechend über *lac*I und IPTG. Eine für den Repressor codierende *lac*I-Sequenz liegt auf dem Vektor. Das Translationsprodukt des klonierten AS-Gens trägt vektorcodiert einen N-terminalen 6x-His-tag (siehe Abb. 7). Ein β-Lactamase-Gen verleiht dem transformierten *E.-coli*-Stamm eine Resistenz gegen Ampicillin. Das konstruierte Plasmid wurde pJQA1000 genannt. Das Genprodukt war 639 AAn groß. Die N-terminale AA-Sequenz ist in Abb. 8 gezeigt.

Wildtyp (pJGA1000)	-----MLTPTQQVGLILQYLKTRILD...
pJEA1000	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSRRASVHMASMTGGQQMGRDPNS QYLKTRILD...
pJQA1000	----- MRGSHHHHHHTDPNS QYLKTRILD...

Abb. 8. Sequenzvergleich N-terminaler Aminosäuren von WT und His-tag-ASn. Die AAn sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. In fett dargestellt sind die vom Vektor codierten AAn, alle übrigen vom WT-AS-Gen. Die Codons der AA-Sequenz PNS (Übergang von Vektor zu AS) enthalten die neu eingeführte *EcoRI*-Schnittstelle.

Tab. 16 gibt einen Überblick über die drei im Verlauf der Arbeit hergestellten Plasmid-Konstrukte. Zur Synthese des unveränderten WT-Proteins wurde das Plasmid pJGA1000 generiert. Für die Expression, die primäre Charakterisierung der WT-AS mit His-tag sowie als Ausgangspunkt für die gezielten Varianten diente das Plasmid pJEA1000, und als Ausgangspunkt für die Erzeugung der Variantenbanken mit lokal begrenzten statistischen Änderungen diente pJQA1000.

Tab. 16. Allgemeine Eigenschaften der Plasmid-Konstrukte mit WT-AS und ihrer Genprodukte

Plasmidkonstrukt	Resistenz gegen	Größe des Genprodukts (AA)	Reinigungs-tag	Promotor	Vollständige WT-Sequenz
pJGA1000	Ampicillin	636	Ohne	T7/SP6	Ja
pJEA1000	Kanamycin	665	N-terminaler His-tag	T7	Nein
pJQA1000	Ampicillin	639	N-terminaler His-tag	T5	Nein

3.1.2. Expression der Gene und Aktivitätsnachweis der Genprodukte

3.1.2.1. Nachweis der Biosynthese und Aktivität von AS *in vivo*

Zum Nachweis der Biosynthese und der Aktivität der Genprodukte der klonierten Gene wurden die Plasmide in geeignete *E.-coli*-Wirtszellen laut Tab. 17 eingebracht. Für die Expression des Gens unter der Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Promotors wurde der *E.-coli*-Wirtstamm BL21*(DE3) eingesetzt. Dieser Stamm verfügt über ein Gen für die T7-RNA-Polymerase, welches unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren *lacUV5*-Promotors steht (λ DE3 Lysogen). Die T7-RNA-Polymerase kann hinter einem späten T7-Promotor klonierte Gene transkribieren. BL21*(DE3) trägt ein mutiertes *rne*-Gen (*rne131*), das für eine verkürzte Rnase E codiert. Diese hat die Fähigkeit verloren, mRNA abzubauen mit der Folge, dass die Stabilität mancher mRNAs steigt, und sie so länger für die Translation zur Verfügung stehen [72,73].

Tab. 17. Kombinationen von Plasmid-DNA und *E.-coli*-Zellen für den Nachweis der Polymerbildung *in vivo*

Nr.	Wirtstamm	Plasmid
1	BL21*(DE3)	pJEA1000
2	BL21*(DE3)	pJGA1000
3	DH5 α	pJQA1000

Ein einfacher qualitativer Nachweis für die Aktivität der AS erfolgte *in vivo* durch die Iodfärbung der Amylose-Ketten nach Wachstum auf LB-Agar mit 5 % Sac-Anteil (siehe Kapitel 2.8.7). Bei RT sublimiert im Deckel der Petrischale befindliches Iod und lagert sich in die schraubenförmige Polymerstruktur ein, wodurch eine Blaufärbung entsteht.

Die Expression der His-tag-AS-Gene von pJEA1000 und pJGA1000 ist in BL21*(DE3), die von pJQA1000 ist wirtsunabhängig mit IPTG induzierbar. In Abb. 9 sind die Ergebnisse der Färbungen gezeigt. Alle drei Kombinationen zeigten sowohl mit als auch ohne Induktion eine Färbung der Zellen allein oder zusätzlich mit Hof um die Zellen. Es wurde augenscheinlich in allen Fällen aktive AS gebildet. Offenbar erfolgte bei Stamm Nr.1 und Nr.3 eine Freisetzung von Glucanen und/oder AS in das umgebende Medium. Die Kontrollversuche mit den *E.-coli*-Zellen mit Plasmiden ohne AS-Gen zeigten keine Färbung (hier nicht gezeigt). Die Stämme Nr.1 und Nr.3 wiesen deutlich stärkere Färbungen auf als Stamm Nr.2. Dies deutet auf eine geringere Menge von AS hin, möglicherweise aufgrund einer schlechteren Translation der resultierenden mRNA des Gens infolge einer für *E. coli* ineffizienteren RBS.

Ein positiver Effekt einer IPTG-Zugabe ins Medium war nur bei Stamm Nr. 2 sichtbar. Bei den Stämmen Nr.1 und Nr.3 war auch in Abwesenheit des Induktors IPTG eine starke Polymerbildung sichtbar. Eine ineffiziente Repression durch das lac-System wurde schon häufiger beobachtet. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass auf beiden verwendeten Plasmiden das Gen für den Repressor (*lacI*) vorhanden ist.

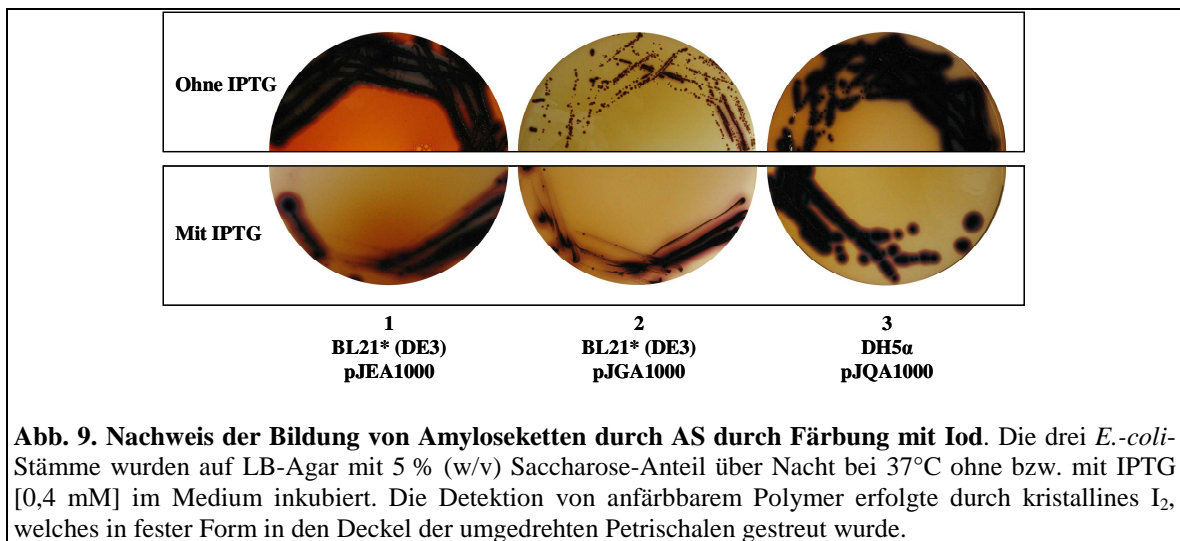
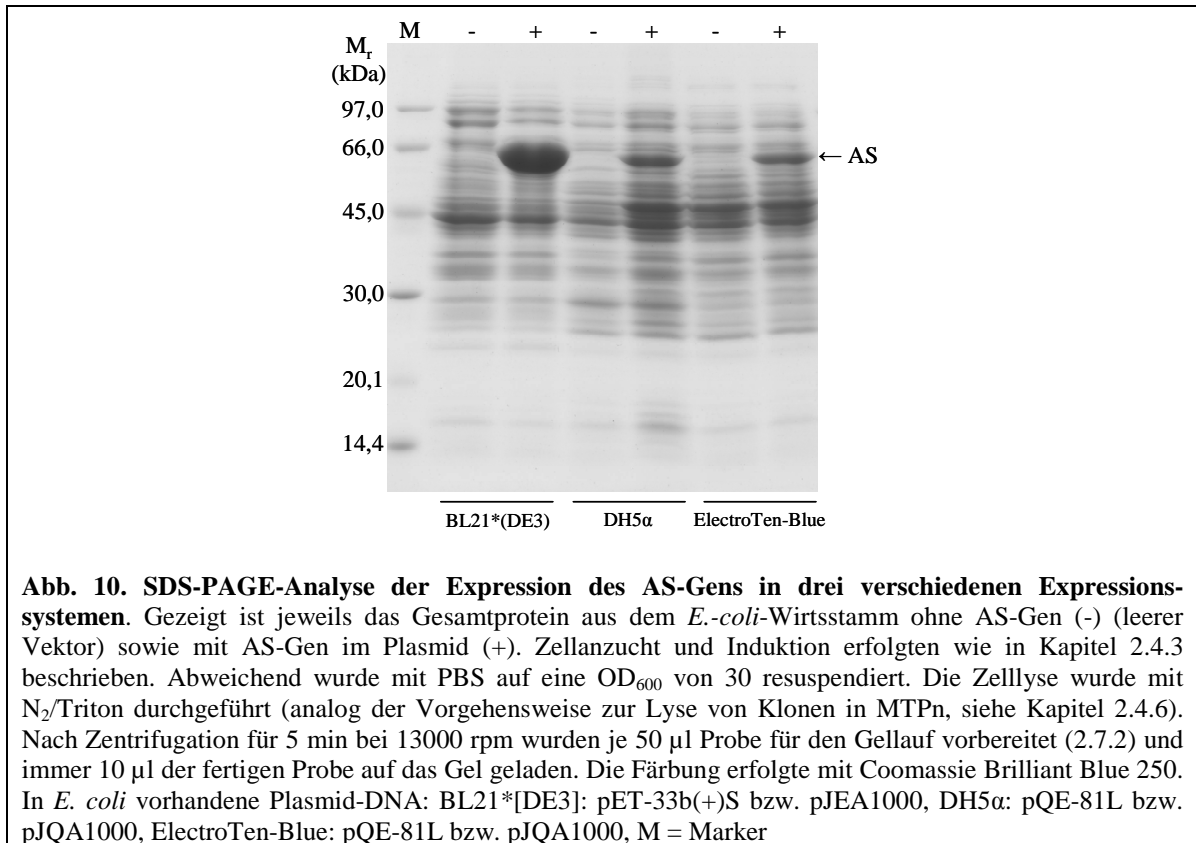


Abb. 9. Nachweis der Bildung von Amyloseketten durch AS durch Färbung mit Iod. Die drei *E.-coli*-Stämme wurden auf LB-Agar mit 5 % (w/v) Saccharose-Anteil über Nacht bei 37°C ohne bzw. mit IPTG [0,4 mM] im Medium inkubiert. Die Detektion von anfärbbarem Polymer erfolgte durch kristallines I₂, welches in fester Form in den Deckel der umgedrehten Petrischalen gestreut wurde.

3.1.2.2. Quantität und Kinetik der Genexpression

Die Mengen der in den verschiedenen Expressionssystemen gebildeten AS wurden durch SDS-PAGE verglichen.

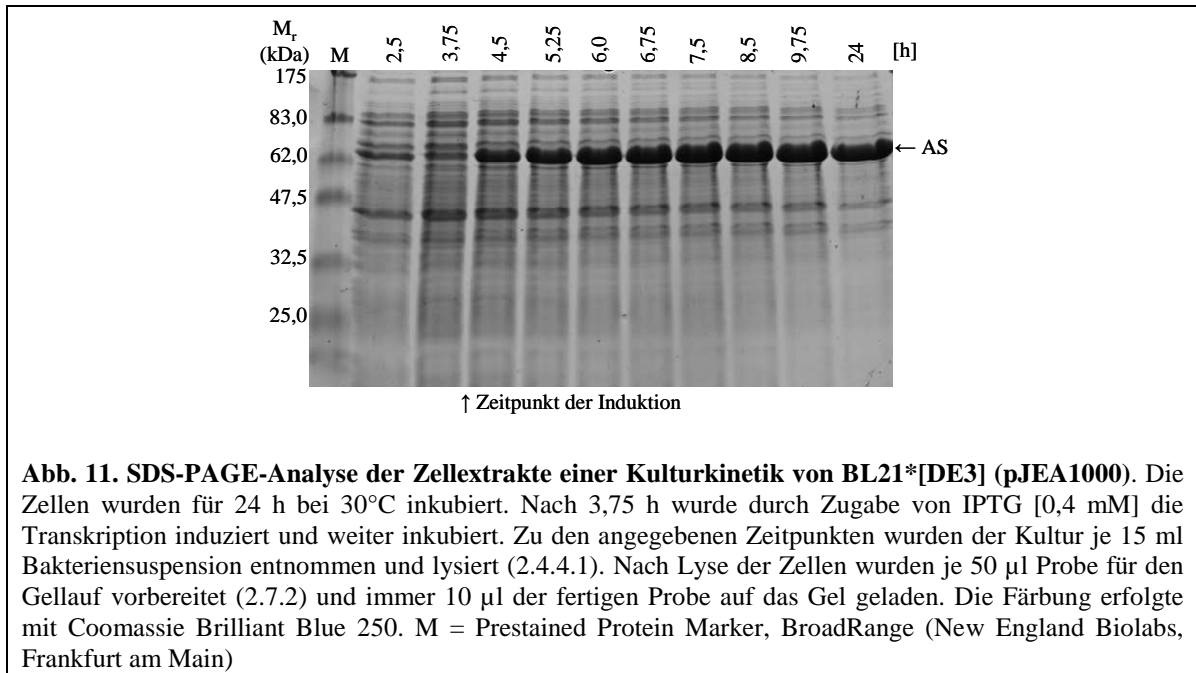
Abb. 10 zeigt, dass nach ÜNK die Konzentration an Zielprotein bei BL21*(DE3) pJEA1000 deutlich am höchsten war. DH5α und ElectroTen-Blue mit pJQA1000 zeigten jeweils vergleichbare Bandenintensitäten. Die Wirtsstämme ohne AS-Gen (Kontrollen) enthielten allesamt keine AS-Bande.



Zur Ermittlung der Bedingungen für eine optimale Proteinproduktion mit pJEA1000 in BL21*(DE3) wurde eine Kulturkinetik durchgeführt. Mit einer ÜNK von BL21*[DE3] (pJEA1000) wurden 200 ml LB-Medium einschließlich Antibiotikum angeimpft und bei 30°C und 120 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 15 ml Probe entnommen und die OD₆₀₀ gemessen. Nach 3,75 h wurde bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,9 in einem Teil der Kultur durch Zugabe von IPTG [0,4 mM] die Transkription induziert. Die Inkubation wurde für weitere 20,25 h fortgesetzt, wobei weiter regelmäßig Proben entnommen wurden. Diese Proben wurden sofort nach Entnahme für 10 min mit 8000 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet bei -70°C bis zur Lyse eingefroren. Die Lyse erfolgte mit dem „Relay 96 Protein Screen Kit“ (siehe Kapitel 2.4.4.1).

Mit IPTG induzierte Zellen zeigten unter den gewählten Bedingungen kein verändertes Wachstumsverhalten gegenüber nicht induzierten Zellen. Im Kontrollansatz ohne Induktion konnte nach etwa 6 h ebenfalls die Entstehung einer prägnanten Bande mit der Mobilität der AS beobachtet werden. Dies stimmt qualitativ mit dem Ergebnis der Polymerbildung *in vivo* Abb. 9 (1) überein.

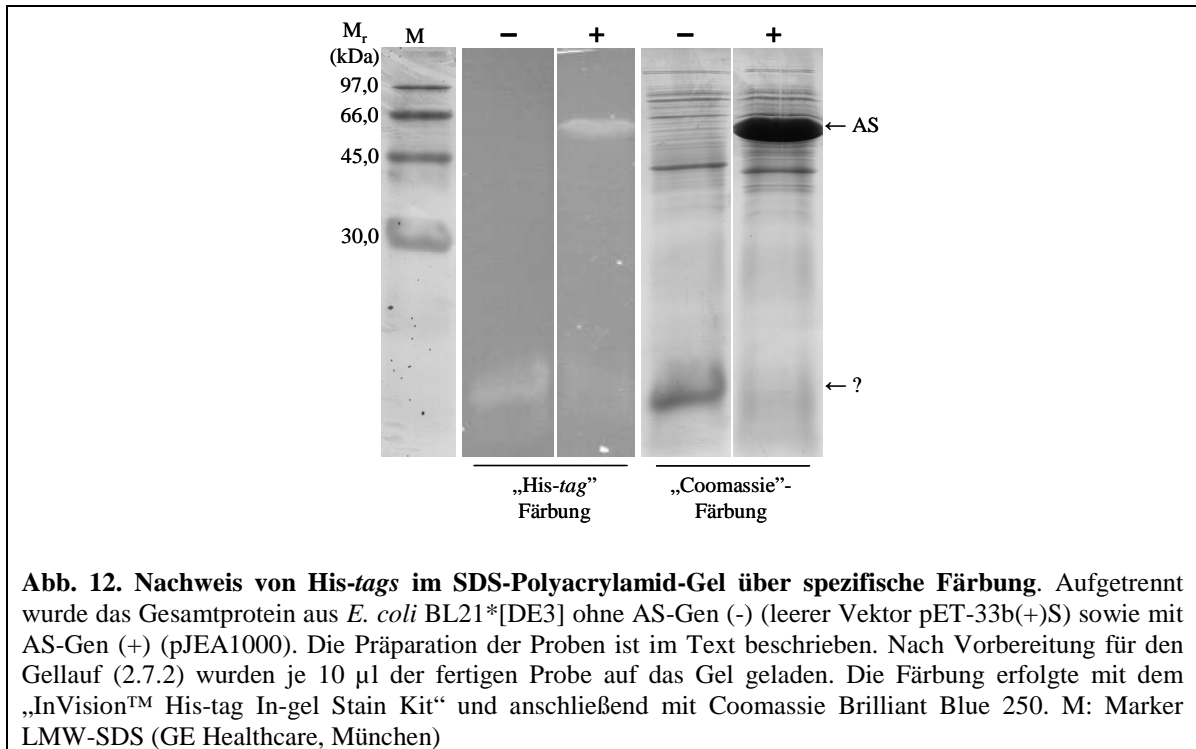
Wie in Abb. 11 gezeigt war etwa 4-5 h nach Induktion die Konzentration der AS am höchsten. Die Proteinmenge war danach über die Versuchsdauer von 24 h stabil. Die Expression wurde durch IPTG deutlich sichtbar erhöht. Über die Dauer des Versuchs konnte zusätzlich eine Anreicherung der AS festgestellt werden, resultierend aus der Abnahme der Konzentration der Wirtsproteine relativ zur AS.



3.1.2.3. Nachweis der AS über His-tag-Färbung

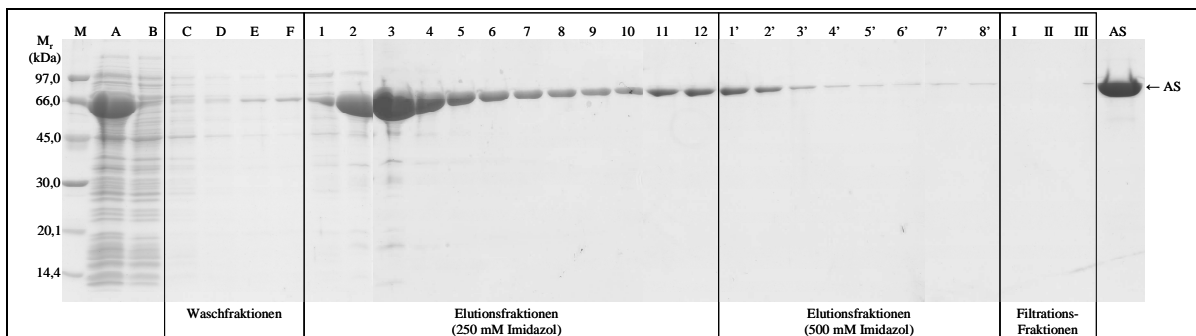
Um zu überprüfen, ob die His-tags der Genprodukte nicht durch Proteolyse abgespalten wurden, wurde eine Anfärbung des His-tags mit dem „InVision™ His-tag In-gel Stain Kit“ der Firma Invitrogen durchgeführt. Die Färbelösung enthält einen fluoreszierenden Farbstoff, konjugiert mit einem Ni²⁺:Nitrilotriessigsäure-Komplex (engl.: *nitrilotriacetic acid*, NTA). Das Ni²⁺ bindet spezifisch an Oligo-Histidin-Sequenzen. Dazu wurden, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, Proteinpräparationen von BL21*(DE3) mit bzw. ohne pJEA1000-Plasmid hergestellt. Die Pellets wurden abweichend mit PBS (statt NBB) und auf OD₆₀₀ = 50 (statt 100) resuspendiert, da keine nachfolgende Aufreinigung erfolgte.

Der Aufschluss der Zellen wurde per French Press (2.4.4.2) durchgeführt. Die Lyse erfolgt mechanisch, indem die Probe mit hohem Druck durch ein enges Ventil gepresst wird. Die beim Austritt durch das Auslassventil auftretenden Scherkräfte und Kavitationseffekte zerstören die Zellwände der Bakterien. Die Proben wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und Proteine zunächst über die His-tag-spezifische Färbung detektiert. Anschließend erfolgte mit demselben Gel die unspezifische Anfärbung sämtlicher Proteine mittels Coomassie Brilliant Blue R250 (siehe Abb. 12). Die Bande mit der für AS erwarteten Mobilität wurde spezifisch gefärbt. Zusätzlich war bei beiden Proben noch eine weitere Bande im unteren Bereich des Gels mit einer geschätzten Größe von 15-25 kDa sichtbar. Dieses Protein kann kein Abbauprodukt der AS sein. Seine Konzentration war ohne AS-Gen deutlich höher. Die Translation des ORF des pET-33b(+) ohne AS-Insert würde lediglich ein Protein-Artefakt mit einer theoretischen Größe von ca. 6,3 kDa ergeben. His-tag-spezifisch färbbare AS-Proteolyseprodukte wurden nicht beobachtet. Weitere Wirtsprotein-Banden wurden durch die His-tag-spezifische Färbung nicht angefärbt.



3.1.2.4. Aufreinigung von 6x-His-tag-ASn

Zur einfachen Aufreinigung der Genprodukte von pJEA1000 und pJQA1000 diente die Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. Das verwendete Nickel-Chelat-Harz nutzt den chelatbildenden Liganden Iminodiessigsäure (IDA) in einer hochvernetzten Agarose-Matrix. IDA bindet Ni^{2+} -Ionen an drei Koordinationsstellen. Die Histidin-Reste von Oligo-His-Segmenten binden an die vierte Koordinationsstelle der immobilisierten Ni^{2+} -Ionen.



Ein konzentrierter Zellextrakt (siehe 2.4.4.2) wurde auf die Säule aufgezogen. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte mit einer 250 mM Imidazol-Lösung. Imidazol verdrängt die Oligo-His-Sequenzen von den Ni^{2+} -Ionen. Die Fraktionen 2-8 der Elution mit NEB I wurden standardmäßig für die weitere Verwendung vereinigt. Wie aus Abb. 13 ersichtlich ist, war in diesem Bereich die Konzentration der AS am höchsten, besonders in den Fraktionen 2 bis 6. Auf die Nutzung weiterer Elutionsfraktionen wurde verzichtet.

Die Lagerung der aufgereinigten AS im Elutionspuffer führte insbesondere bei tieferen Temperaturen (-70°C) zu einer schwer reversiblen Präzipitation des Proteins, möglicherweise aufgrund der hohen Imidazol-Konzentration und/oder einer hohen Protein-Konzentration. Die Analyse des Pellets durch Zugabe von 2x Probenpuffer (*Cracking-Puffer*) und Auftrennung per SDS-PAGE zeigte eine starke AS-Bande. Das Pellet ließ sich auch durch mehrstündiges Rühren und leichtes Erwärmen nicht wieder resuspendieren.

Diese Präzipitation wurde durch einen Pufferwechsel (2.2.2.3) und die Zugabe von Glycerin (10 % in Endkonzentration) vor der Lagerung bei -70°C verhindert. Unter Standard-Bedingungen war kein Einfluss des Glycerins auf die Aktivität der AS zu verzeichnen. Die Charakterisierung sämtlicher Tyr147-Varianten (siehe Kapitel 3.2.4) wurde daher mit AS-Präparationen durchgeführt, denen Glycerin zugesetzt worden war. Wie erst später gefunden wurde, diente Glycerin jedoch als Akzeptor und änderte die Aktivität und den Hydrolyseanteil unter anderen als Standard-Bedingungen messbar (3.1.3.3.3). Den zeitlich später hergestellten Proteinpräparationen der Polymer-negativen Varianten (siehe Kapitel 3.3.5) wurde daher kein Glycerin zugesetzt, da sich die Präzipitation von AS allein durch den Pufferwechsel verhindern ließ. Die Protein-Konzentration wurde zudem auf ca. 1 mg/ml begrenzt. Genauere Untersuchungen zu den möglichen Ursachen der Präzipitation wurden nicht durchgeführt.

Zur Bilanzierung des Reinigungsverfahrens wurde exemplarisch der Proteingehalt und die Aktivität einzelner Fraktionen von His-tag-AS aus BL21*[DE3] (pJEA1000) gemessen (siehe Tab. 18).

Tab. 18. Protein- und Aktivitätsbilanz der Aufreinigung von His-tag-AS über Nickel-Chelat Affinitätschromatographie

Nr. der Fraktion	Beschreibung der Fraktion	Volumen [ml]	Protein-Konzentration [mg/ml]	Protein-masse [mg]	Einheiten [U]	Spez. Aktivität [U/g]
1	Zellextrakt OD ₆₀₀ = 100	2,5	8,86	22,1	69,1	3120
2	Summe der Durchfluss- und Waschfraktionen	$\sim 5 \times 7^1$	variabel ¹	$\sim 9,96^1$	n.b.	n.b.
3	Elutionsfraktionen NEB I, 2-8	6,7	1,17	7,84	n.b.	n.b.
4	Elutionsfraktionen NEB I, 1, 9-12	$\sim 5^1$	variabel ¹	$\sim 0,82^1$	n.b.	n.b.
5	Elutionsfraktionen NEB II	$\sim 8^1$	variabel ^{1,2}	$\sim 0,28^{1,2}$	n.b.	n.b.
6	Summe der Fraktionen 2-5			18,9		
7	Umpuffern von Fraktion 3	1,2	4,98	6,12	75,0	12300

¹⁾ Volumen der aufgefangenen Elutionsfraktionen nur ungefähr bestimmt, Proteinmasse ist daher ein Näherungswert.

²⁾ Zum Teil Messwerte mit sehr geringer (einstelliger) Absorption bei der Bestimmung der Protein-Konzentration (Schätzwert).

n.b.: Nicht bestimmt.

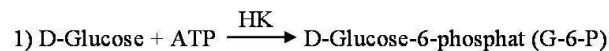
Die Proteinmenge in Fraktion 7 entsprach 78 % der von Fraktion 3 eingesetzten Menge. Die Proteine gingen vermutlich durch Filtration beim Umpuffern verloren. Bei 100 % Reinheit der AS-Präparation in Fraktion 7 betrüge die AS-Ausbeute 28 % der Proteine in Fraktion 1 bzw. 32 % der Proteine in Fraktion 6. Diese Werte bestätigen den optischen Eindruck des hohen Anteils von AS im Zellextrakt im Proteingel (siehe Abb. 10, BL21*[DE3] (pJEA1000)). Die Ausbeute an AS-Aktivität in Fraktion 7 betrug 109 % bezogen auf Fraktion 1. Die Zunahme der Aktivität deutet auf eine geringe Hemmung der AS durch Bestandteile im Gesamtextrakt hin. Der relativ geringe Aufreinigungsfaktor von 3,9, bezogen auf die spezifische Aktivität, spiegelt ebenfalls den hohen Prozentsatz von AS im Zellextrakt wider. Die Reinheit verschiedener AS-Präparationen lag nach Analyse über SDS-PAGE bei 86-91 % (2.7.6). Die restliche Imidazol-Konzentration in der gereinigten Präparation betrug ca. 6 mM.

Aus 1 l Bakterienkultur BL21*[DE3] (pJEA1000), normiert auf eine $OD_{600} = 1$, ließen sich rund 280 U aufgereinigte AS gewinnen.

3.1.2.5. Standard-Bedingungen der AS-Reaktion und Prinzip der Aktivitätsmessung

Standardmäßig wurden zur Messung der AS-Aktivität 146 mM (50 g/l) Sac und 0,1 g/l Glycogen eingesetzt (siehe Kapitel 2.8.1). Die relativ kurze Inkubationsdauer von 15 min begrenzt den Fehler, der durch die Inaktivierung der Amylosucrase über die Zeit auftreten kann, auf unter 1 % (Halbwertszeit von AS bei 30°C: 21 h [41]).

Die Messung basiert auf dem Protokoll nach Mayer [74], abgeändert, um Glc- und Fru-Freisetzung separat messen zu können. In dem gekoppelten enzymatischen Test katalysiert zunächst das Enzym Hexokinase (HK) die Phosphorylierung der durch Hydrolyse gebildeten freien Glc mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP).



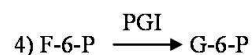
Anschließend wird G-6-P von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP^+) in Gegenwart von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) spezifisch zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert, wobei NADP^+ zu NADPH reduziert wird.



Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist daher der Glc-Menge äquivalent und wird aufgrund ihrer Absorption bei 340 nm bestimmt (Molarer Extinktionskoeffizient (ϵ) von NADPH bei 340 nm = $6300 \text{ [l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$). Hexokinase katalysiert auch die Phosphorylierung der durch Spaltung der Sac gebildeten Fru mit ATP zu Fructose-6-phosphat (F-6-P).



Nach Ablauf der Reaktion 3) wird F-6-P durch Phosphoglucose-Isomerase (PGI) in G-6-P überführt.



G-6-P reagiert wiederum mit NADP unter Bildung von D-Gluconat-6-phosphat und NADPH (Reaktion 2). Auch hier ist NADPH Messgröße. Die nun gebildete NADPH-Menge ist der Fru-Menge äquivalent. Die Summe der Konzentration von Glc und Fru abzüglich der Konzentration der Glc ergibt schließlich die freie Fru.

Die Absorption von NADPH wurde in Konzentrationen von 0,12 bis 3,2 mM bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Bis zu einer Absorption von 2,5 blieb dabei das Verhältnis von Konzentration zu Absorption linear. Durch geeignete Proben-

Vorverdünnungen mit ddH₂O wurde dennoch darauf geachtet, Absorptionen von 1,0 möglichst nicht zu überschreiten.

3.1.3. Charakterisierung von His-tag-AS

Die ersten Schritte der Charakterisierung der His-tag-AS bestanden in der Analyse der Aktivität mit dem natürlichen Substrat Sac sowie mit dem bekannten Aktivator Glycogen. Ferner wurden andere Zucker oder Glycoside als potentielle Donor- oder Akzeptor-Substrate untersucht. Schließlich wurde getestet, ob der Umsatz von Sac-Analoga erfolgt.

Die His-tag-AS-Genprodukte von pJEA1000 und pJQA1000 werden im weiteren Verlauf der Einfachheit halber auch als WT bezeichnet.

3.1.3.1. Gesamt-, Transfer- und Hydrolyse-Aktivität im Standard-Test

Die Aktivität wurde unterteilt in Gesamt-Aktivität (Total, Messung der freigesetzten Fru), Hydrolyse-Aktivität (Hyd, Messung der freigesetzten Glc) und Transfer, d. h. Aktivität, die Glc auf einen anderen Akzeptor als Wasser überträgt (Tra, freigesetzte Fru minus freigesetzte Glc).

Eine Einheit AS wurde definiert als die Proteinmenge, die pro Minute die Freisetzung von 1 µmol Fru unter den Bedingungen des Standard-Tests (siehe Kapitel 3.1.2.5) katalysiert. Messwert für die spezifische Gesamtaktivität war die freigesetzte Fru im Reaktionsansatz. Nicht berücksichtigt wurde hierbei, dass freie Fru in geringem Maß als Akzeptor durch Glucosylierung dieser Messung entzogen werden kann. Eine solche Bildung von Sac-Isomeren ließ sich im Produktmuster einiger DC-Analysen (siehe Kapitel 3.1.3.2) erkennen und ist in der Literatur [41] beschrieben. Relevante Werte ergeben sich allerdings erst bei höheren Fru-Konzentrationen im späteren Verlauf der Reaktion [44,75].

3.1.3.1.1. Saccharose als einziges Substrat

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS:	WT (ElectroTen-Blue/pJQA1000), gereinigt, 17,95 µg/ml
Donor-Substrat:	Saccharose [146 mM]
Zugesetzte Akzeptoren:	keine
Inkubationsdauer:	15 min
Analytik:	UV-photometrisch (340 nm)

Die Reaktionsbedingungen für die Ermittlung der Werte in Tab. 19 entsprechen den Standard-Bedingungen, jedoch in Abwesenheit von Glycogen.

Tab. 19. Spezifische Aktivität der WT-AS mit 146 mM Saccharose als einzigem Substrat

Spezifische Aktivität [U/g]							
AS	Total		Tra		Hyd		Hydrolyse-Anteil [%]
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
WT	421	9	14.4	4.8	407	10	96.6

Unter den gewählten Bedingungen wurde der Großteil der Sac hydrolysiert. Dieses Ergebnis entspricht Angaben aus der Literatur, nach denen zu Beginn der Reaktion zunächst Glc und Fru durch Hydrolyse von Sac gebildet werden. Glc wird anschließend von AS als Akzeptor zur Kettenverlängerung genutzt [44].

3.1.3.1.2. Saccharose und Glycogen als Substrate

Die Versuchsbedingungen entsprachen denen aus Kapitel 3.1.3.1.1, zusätzlich enthielt die Reaktion noch 0,1 g/l Glycogen.

Tab. 20. Spezifische Aktivität der WT-AS mit 146 mM Saccharose und 0,1 g/l Glycogen

AS-Variante	Spezifische Aktivität [U/g]						Hydrolyse-Anteil [%]
	Total		Tra		Hyd		
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
WT	8890	135	8460	127	421	8	4.74

Wie die Ergebnisse (Tab. 20) zeigen, erhöhte sich die spezifische Total-Aktivität um den Faktor 21, und die spezifische Tra-Aktivität stieg ca. 600-fach gegenüber den Werten ohne zusätzlichen Akzeptor (Tab. 19, 3.1.3.1.1). Der Hydrolyse-Anteil war deutlich geringer als ohne Glycogen. Die spezifische Hyd-Aktivität war jedoch ähnlich hoch. Der Anstieg der Gesamtaktivität resultierte also ausschließlich aus dem Anstieg der Tra-Aktivität. Potocki de Montalk *et al.* ermittelten unter annähernd gleichen Bedingungen mit einer gegenüber dem WT N-terminal um elf AAn verkürzten AS eine ca. 8 % höhere Gesamtaktivität von ca. 9600 U/g (Reaktionspuffer: 50 mM Tris-HCl [pH 7,0], 150 mM, NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) [25]. Die Anwesenheit von Tris, einem potentiellen Akzeptor für AS (siehe Kapitel 3.1.3.3.3) sowie der geringere pH-Wert beeinflussen sehr wahrscheinlich die Aktivität positiv. Ein abweichendes Ergebnis kann ferner durch die Unterschiede im N-Terminus der beiden untersuchten Enzyme entstehen.

3.1.3.1.3. Effekt steigender Glycogen-Konzentrationen auf die spezifische Aktivität von AS

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS:	WT (BL21*(DE3)/pJEA1000), gereinigt, 1,92 µg/ml
Donor-Substrat:	Saccharose [146 mM]
Zugesetzter Akzeptor:	Glycogen [0-10,0 g/l]
Komponenten der AS-Lösung ¹⁾ :	Glycerin [3 mM]
Inkubationsdauer:	15 min
Analytik:	UV-photometrisch (340 nm)

¹⁾ Erwähnt sind solche, die ebenfalls als Akzeptor wirken können (siehe Kapitel 3.1.3.3.3).

Der aktivierende Effekt von Glycogen durch die Wirkung als effizienter Akzeptor ist bereits ausführlich untersucht und beschrieben worden [40,44]. Die Analyse wurde dessen ungeachtet wiederholt, um den direkten Vergleich der in dieser Arbeit erzeugten His-tag-ASn mit den Tyr-Varianten (Kapitel 3.2) zu ermöglichen.

Ferner wird diskutiert, dass die Bindung von Glycogen an der AS vermutlich durch eine Konformationsänderung der AS die Transfer-Aktivität fördert [20,44].

Die Versuche wurden unter Standard-Bedingungen ohne und mit 0,1, 1,0 und 10,0 g/l Glycogen durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten und der Hydrolyse-Anteil sind in Abb. 14 graphisch dargestellt.

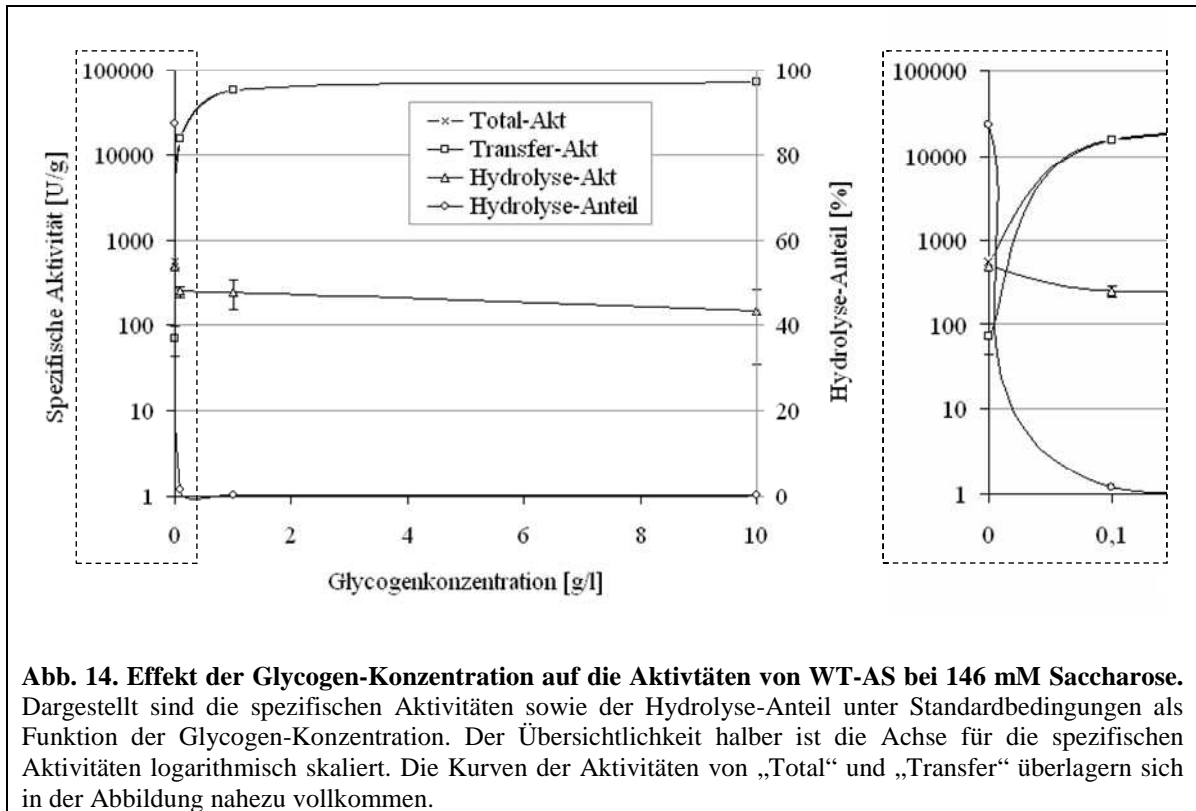


Abb. 14. Effekt der Glycogen-Konzentration auf die Aktivitäten von WT-AS bei 146 mM Saccharose. Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten sowie der Hydrolyse-Anteil unter Standardbedingungen als Funktion der Glycogen-Konzentration. Der Übersichtlichkeit halber ist die Achse für die spezifischen Aktivitäten logarithmisch skaliert. Die Kurven der Aktivitäten von „Total“ und „Transfer“ überlagern sich in der Abbildung nahezu vollkommen.

Der Zusatz von 0,1 g/l Glycogen erhöhte relativ zu der Messung in Abwesenheit von Glycogen die Tra-Aktivität über 200-fach. Der aktivierende Effekt verhielt sich nicht linear zur Glycogen-Konzentration. Eine jeweilige Verzehnfachung führte nur zu einer 4-fachen bzw. 1,2-fachen Steigerung der Aktivität. Dieser Sättigungseffekt wurde bereits (mit einer gegenüber dem WT N-terminal um elf AAn verkürzten AS) bei [40] beschrieben. Abweichend wurde in der vorliegenden Arbeit auch bei Glycogen-Konzentrationen von ≥ 1 g/l noch eine geringe Hydrolyse-Aktivität gemessen.

Die hier (3.1.3.1.3) ermittelten Ergebnisse wichen von den Werten der Messungen ohne (3.1.3.1.1) bzw. mit 0,1 g/l Glycogen (3.1.3.1.2) ab. Im Gegensatz zu den zuvor bestimmten Werten war hier jeweils der Hydrolyse-Anteil geringer (ca. 87 %) und die Tra-Aktivität ca. 1,3-fach erhöht. Die Versuche wurden mit unterschiedlichen AS-Präparationen (aus verschiedenen Expressionssystemen) durchgeführt, was eventuell einen Einfluss auf die Aktivität hat, allerdings vermutlich nicht allein die starke Abweichung erklären kann. Da zeitlich gesehen der Glycogen-Konzentrations-Effekt vor den Erkenntnissen der Experimente aus Kapitel 3.1.3.3.3 („Akzeptor-Wirkung verschiedener Pufferkomponenten“) ermittelt wurde, enthielten die Reaktionsgemische in 3.1.3.1.3 mit in der AS-Lösung enthaltenem Glycerin zudem einen zusätzlichen Akzeptor für die AS. Die Glycerin-Konzentration lag bei 3 mM. Nach eigenen Erkenntnissen erhöht Glycerin die Tra-Aktivität, allerdings wurde nicht genauer untersucht, ob diese relativ geringe Menge die Messwerte signifikant erhöhen kann.

3.1.3.2. Maltose und Maltotriose als Substrate

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS:	WT (ElectroTen-Blue/pJQA1000), gereinigt, 179,5 µg/ml
Substrate:	Maltose oder Maltotriose [146 mM] ohne und mit Saccharose [146 mM]
Inkubationsdauer:	24 h
Analytik:	DC

Amylosucrase kann in einer so genannten Disproportionierungs-Reaktion α -1,4-verknüpfte Maltooligosaccharide als Donor- und Akzeptor-Substrat nutzen und Glc-Reste von einem auf ein anderes Oligosaccharid übertragen [42]. Im Falle von Glc5 als Edukt entstehen so zum Beispiel die Produkte Glc4 und Glc6. Diese können ihrerseits als Donor und Akzeptor dienen. Folgendes Experiment sollte zeigen, inwieweit die beiden kürzesten Vertreter von α -1,4-verknüpften Maltooligosacchariden – Maltose (Glc2) und Maltotriose (Glc3) – von der AS genutzt werden konnten. Beide wurden als jeweils einziges Substrat, sowie mit Sac als zusätzlichem Donor für 24 h bei 30°C mit der 10-fachen Enzymmenge wie in Kapitel 3.1.3.1.1 inkubiert und anschließend per DC analysiert (siehe Abb. 15). Enzymmenge und Inkubationszeit wurden deutlich erhöht, um auch schwache Umsätze sichtbar werden zu lassen. Zu Vergleichszwecken wurde die Reaktion mit Sac [75 mM] als einzigem Substrat mit aufgetragen.

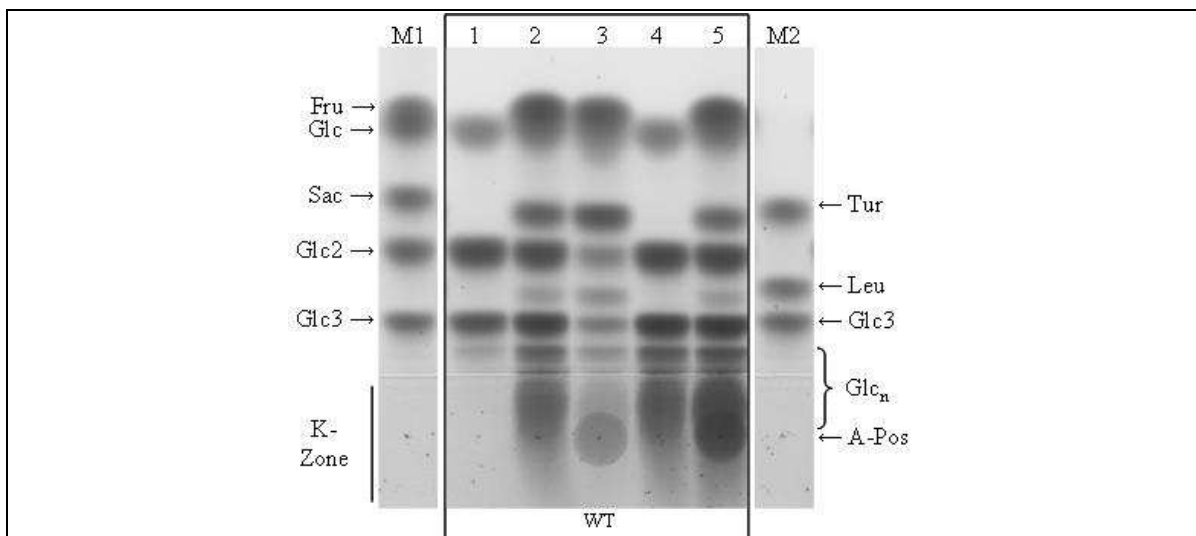


Abb. 15 . DC-Analyse der Reaktionsprodukte von WT-AS mit Maltose oder Maltotriose ohne und mit Saccharose. Aufgereinigte WT-AS wurde für 24 h bei 30°C mit Glc2 bzw. Glc3 als alleinigem Substrat inkubiert. Parallel wurden die beiden Reaktionen jeweils mit zusätzlicher Sac durchgeführt (alle Konzentrationen 146 mM). Die mittlere Bahn enthält als Vergleich die Umsetzung von Sac als einzigem Substrat (75 mM). Aufgetrennt wurden je 1,25 µl der Reaktion nach Hitzeinaktivierung und 1:6 Verdünnung mit H₂O (Bahn 3 nur 1:3) mit Ethylacetat/ Isopropanol/ H₂O (5:4:1, v/v/v). Substrate: Bahn 1 = Glc2, 2 = Glc2 + Sac, 3 = Sac, 4 = Glc3, 5 = Glc3 + Sac. M1 und M2 = Marker. Glc_n = Oligosaccharide mit Kettenlängen ab vier Glc-Einheiten.

Zwischen Glc2 und Glc3 konnten signifikante Unterschiede beobachtet werden. Bei Glc2 waren neben dem Edukt hauptsächlich Glc1 und Glc3 erkennbar sowie Spuren von Glc4. Bei Glc3 fanden sich neben dem Edukt sowohl Glc1, Glc2 als auch länger-kettige Oligosaccharide, die in der Konzentrierungszone verblieben. In Gegenwart von Sac

wurden Glc2 und Glc3 ähnlich gut elongiert. Offenbar ist eine geringe Donor-Aktivität von Glc2 für dessen schlechte Verlängerung verantwortlich. Die Beobachtung anderer Autoren, die beim Umsatz von Maltooligosacchariden (Glc2-Glc7) keine Glc-Freisetzung beschrieben [42], konnte unter diesen Versuchsbedingungen nicht bestätigt werden.

3.1.3.3. Akzeptoren mit Glucose-Anteil im Molekül

Vorversuche hatten ergeben, dass AS nicht nur Glc und α -1,4-verknüpfte Glucane als Akzeptor nutzen kann, sondern auch Glc mit einer Alkyl- bzw. Arylgruppe in α - bzw. β -Stellung am C₁-Atom.

In der Reaktion von AS mit Sac als Substrat wurden die Akzeptoren Arbutin und α -Methylglucose näher untersucht. Bei ihnen ist ein Hydroxyphenyl- bzw. ein Methylrest β - bzw. α -glycosidisch mit Glc verknüpft (siehe Abb. 16). Die Versuchsbedingungen entsprachen denen aus Kapitel 3.1.3.1.1 zuzüglich 146 mM Arbutin bzw. α -MeG1. Die Reaktionsanalyse erfolgte UV-photometrisch wie in Kapitel 3.1.2.5 beschrieben.

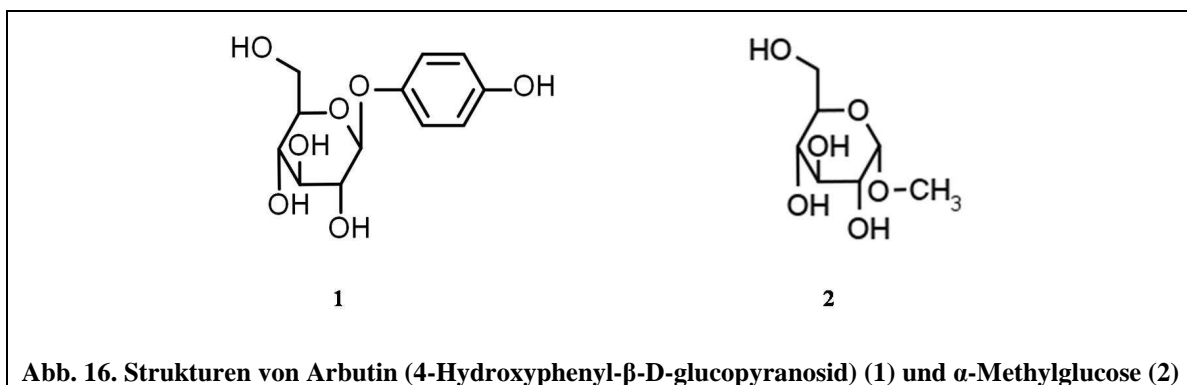


Abb. 16. Strukturen von Arbutin (4-Hydroxyphenyl- β -D-glucopyranosid) (1) und α -Methylglucose (2)

Tab. 21. Spezifische Aktivität der WT-AS mit 146 mM Saccharose und Arbutin bzw. α -MeG1 als Akzeptor unter Standard-Bedingungen

Akzeptor	Spezifische Aktivität [U/g]						Hydrolyse-Anteil [%]
	Total		Tra		Hyd		
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
-	421	9	14,4	4,8	407	10	96,6
Arbutin	123000	1300	124000	1300	394	4	0,32
α -MeGl	7490	74	7110	70	380	5	5.07

Tab. 21 zeigt den deutlichen Einfluss der zusätzlichen Reaktionskomponenten. Die Total-Aktivität erhöhte sich relativ zur Aktivität ohne Akzeptor in Anwesenheit von Arbutin fast um den Faktor 300, die Tra-Aktivität stieg ca. 8500-fach an. Mit α -MeG1 ergab sich eine Erhöhung um den Faktor 18 (Total), bzw. ca. 500 (Tra). Die Hyd-Aktivität war jeweils ähnlich hoch wie in Abwesenheit eines Akzeptors. Der Hydrolyse-Anteil sank demzufolge in beiden Reaktionen stark ab. Arbutin wirkte also als ein ausgezeichneter Aktivator/Akzeptor für die AS. Nicht ganz so stark aktivierend war α -MeG1.

3.1.3.3.1. Effekt steigender Arbutin-Konzentrationen auf die spezifische Aktivität von AS

Mit dem sehr guten Akzeptor Arbutin wurde der Einfluss auf die Sac-Reaktion unter Standard-Bedingungen (3.1.3.1.1), jedoch mit steigender Arbutin-Konzentration untersucht.

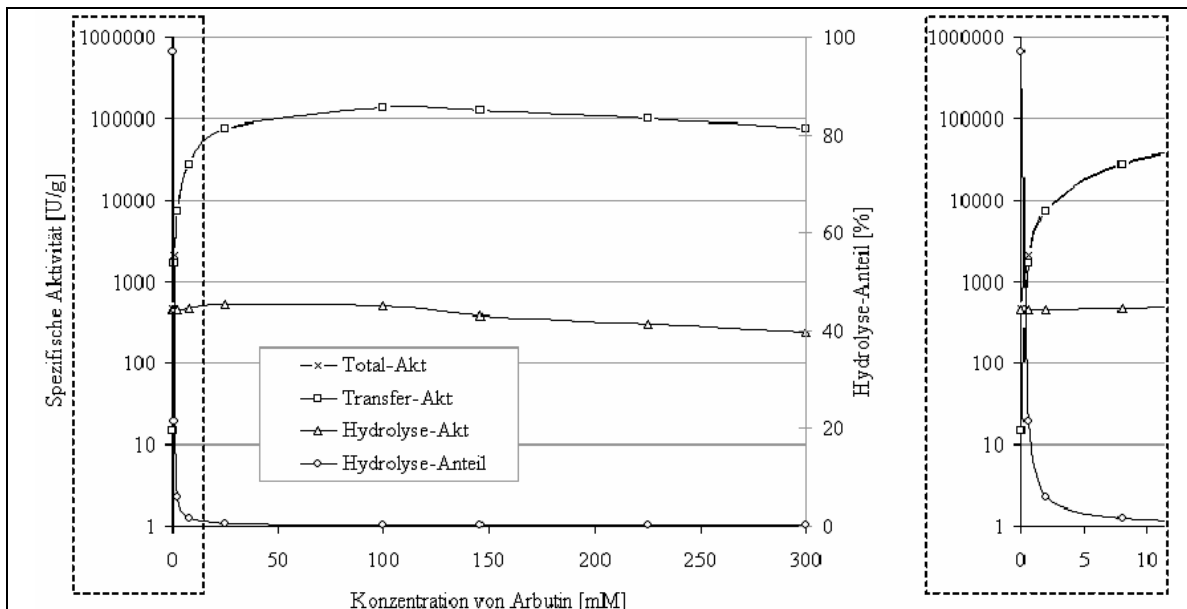


Abb. 17. Effekt der Arbutin-Konzentration auf die Aktivitäten von WT-AS bei 146 mM Saccharose.

Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten sowie der Hydrolyse-Anteil unter Standardbedingungen als Funktion der Arbutin-Konzentration. Der Übersichtlichkeit halber ist die Größenachse für die spezifischen Aktivitäten logarithmisch skaliert. Die Kurven der Aktivitäten von „Total“ und „Transfer“ überlagern sich in der Abbildung nahezu vollkommen

Bei 100 mM durchlief die spezifische Aktivität (Total/Tra) ein Maximum (Abb. 17). Der Hydrolyse-Anteil verringerte sich bereits bei geringer Arbutin-Konzentration stark, was auf eine effektive Nutzung als Akzeptor-Molekül hindeutet. Die spezifische Hyd-Aktivität stieg zunächst leicht an, fiel aber ab einer Arbutin-Konzentration von 100 mM wieder leicht bis unter den Anfangswert ab.

3.1.3.3.2. Analyse der Produkte des Umsatzes von Saccharose mit und ohne die Akzeptoren Arbutin bzw. α -MeG1

Per DC wurde die Produktbildung von AS mit Sac und Arbutin bzw. α -MeG1 als Akzeptor über 24 h verfolgt, um die Elongationsprodukte sichtbar zu machen. Zu Vergleichszwecken wurde die Reaktion auch ohne Akzeptor durchgeführt.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS:	WT (ElectroTen-Blue/pJQA1000), gereinigt, 35,9 μ g/ml
Donor-Substrat:	Saccharose [146 mM]
Zugesetzte Akzeptor(en):	keine, Arbutin bzw. α -MeG1 [146 mM]
Inkubationsdauer:	1 h, 6 h und 24 h
Analytik:	DC

Mit Sac als alleinigem Substrat waren neben Fru, Glc und Fru-Isomeren hauptsächlich Glc2 und Glc3 als Produkte sichtbar sowie Oligomere von Glc4 bis hin zu längeren Oligomeren, welche in der Konzentrierungszone der DC-Platte verblieben (siehe Abb. 18).

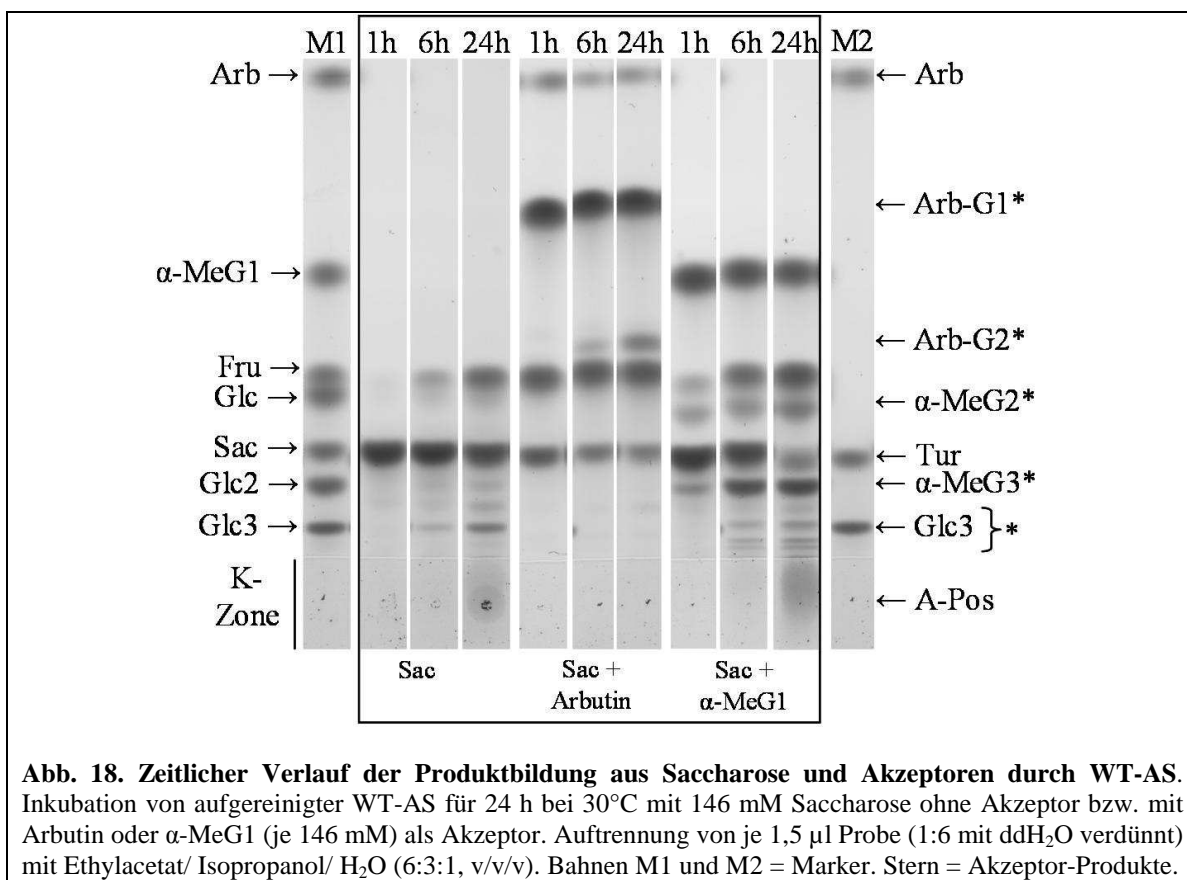


Abb. 18. Zeitlicher Verlauf der Produktbildung aus Saccharose und Akzeptoren durch WT-AS. Inkubation von aufgereinigter WT-AS für 24 h bei 30°C mit 146 mM Saccharose ohne Akzeptor bzw. mit Arbutin oder α-MeG1 (je 146 mM) als Akzeptor. Auftrennung von je 1,5 µl Probe (1:6 mit ddH₂O verdünnt) mit Ethylacetat/ Isopropanol/ H₂O (6:3:1, v/v/v). Bahnen M1 und M2 = Marker. Stern = Akzeptor-Produkte.

In Anwesenheit von Arbutin erfolgte die Übertragung von ein bzw. zwei Glc-Einheiten auf diesen effizienten Akzeptor. Bereits nach einer Stunde war eine große Menge Produkt zwischen den Banden von Arbutin und Fru sichtbar, in Abwesenheit von Arbutin fehlte diese Bande jedoch. Aufgrund der Mobilität von Arbutin und der Analyse der Proben per HPLC (siehe Abb. 19) wurde davon ausgegangen, dass es sich hier um einfach glucosyliertes Arbutin (Arb-G1) handelt. Aus den gleichen Gründen wurde angenommen, dass der Fleck leicht oberhalb der Fru Arbutin mit zwei Glc-Resten (Arb-G2) war. Längere Produkte waren nicht sichtbar. Glycosylierungsprodukte von Arbutin sind später auch für andere Glycosyltransferasen beschrieben worden [76-78].

Mit α-MeG1 als Akzeptor wurden Oligomere bis α-MeG6 sowie längererkettige Produkte in der Konzentrierungszone detektiert, hauptsächlich aber α-MeG2 und α-MeG3. Als Nebenprodukte waren wieder Fru-Isomere sichtbar.

Die Quantifizierung der Akzeptor-Reaktionen mit Arbutin erfolgte per HPLC (siehe Kapitel 2.8.12). Dazu wurde eine Eichkurve mit einer Verdünnungsreihe einer Arbutin-Lösung erstellt. Zur Berechnung der Konzentrationen wurden die Flächen unter den bei einer Wellenlänge von 210 nm aufgezeichneten Peaks verwendet, unter der Annahme gleicher Extinktionskoeffizienten für Arbutin und seine Glucosylierungsprodukte. Es konnten Arbutin, Arb-G1 und Arb-G2, aber keine weiteren Elongationsprodukte detektiert werden (siehe Abb. 19).

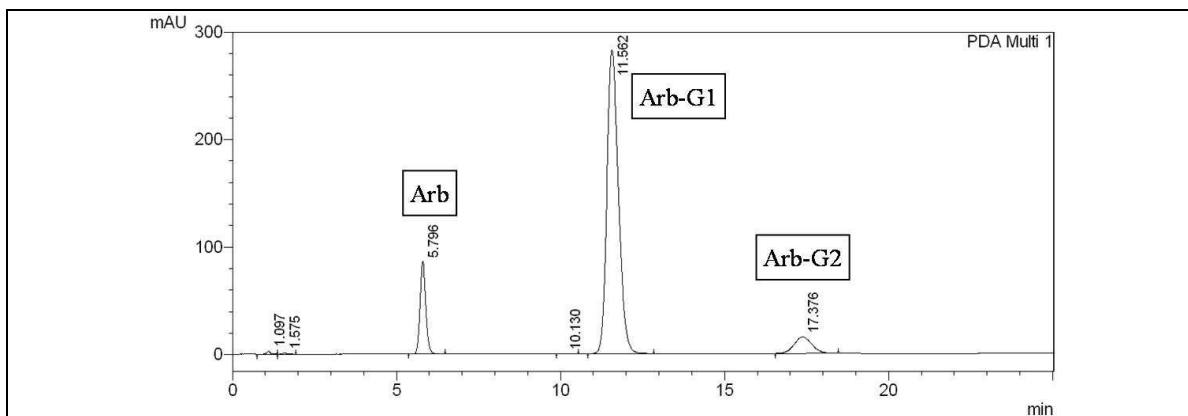


Abb. 19. Chromatographische Trennung der Reaktionsprodukte von WT-AS mit Saccharose und Arbutin. Inkubation von aufgereinigter WT-AS für 24 h bei 30°C mit Saccharose und zusätzlich Arbutin (je 146 mM) als Akzeptor. Nachweis per HPLC (siehe Kapitel 2.8.12). Die für das Chromatogramm verwendete Wellenlänge beträgt 210 nm.

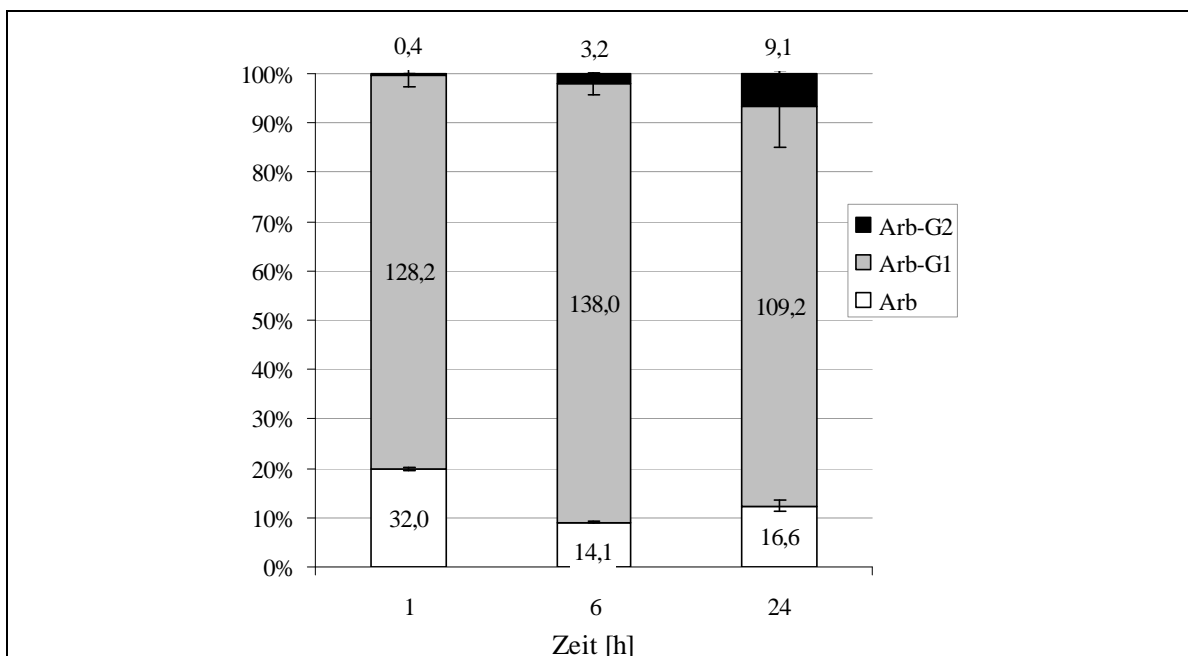


Abb. 20. Quantifizierung des zeitlichen Verlaufs der Glycosylierung von Arbutin durch WT-AS durch Analyse per HPLC. Inkubation aufgereinigter WT-AS für 24 h bei 30°C mit Saccharose als Donor und Arbutin als Akzeptor (je 146 mM). Auftrennung verdünnter Proben (1:50 mit ddH₂O) per HPLC (2.8.12). Die Summe aus Arbutin (Arb) sowie dem einfach (Arb-G1) und dem zweifach (Arb-G2) glycosylierten Elongationsprodukt wurde als 100 % definiert. Die Werte innerhalb der Balken geben die absoluten Konzentrationen [mM] an.

Die Werte der Quantifizierung in Abb. 20 stimmen mit dem optischen Eindruck der DCs überein, wenn man berücksichtigt, dass die Intensität der Färbung einer Probe auf der DC-Platte mit steigender Zahl der Zuckerreste zunimmt, d. h., ein Disaccharid bei gleicher Konzentration etwa doppelt so stark gefärbt ist wie ein Monosaccharid.

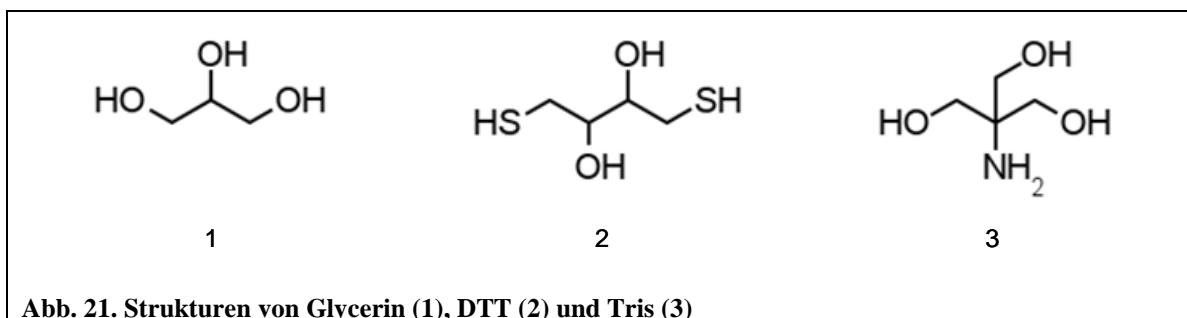
Die Konzentration von Arb-G1 wies bereits nach 1 h auf den Umsatz von über 70 % des Arb (und der Sac) hin. Im weiteren Verlauf stieg die Konzentration von Arb-G1 leicht an und sank zwischen 6 und 24 h etwas ab. Die Konzentration von Arb-G2 stieg über den gesamten Reaktionsverlauf stetig an. Die Summe der drei Konzentrationen sank von 1 h auf 24 h ab (Abb. 20). Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass der Extinktionskoeffizient mit zunehmendem Glucosylierungsgrad leicht abnimmt, wie in

anderen Fällen gemessen (persönliche Mitteilung B. Hofer). Ferner könnten in sehr geringen Konzentrationen längere Elongationsprodukte gebildet worden sein. Die Inkubation von AS mit Arbutin als einzigem Substrat zeigte auf einer DC weder Glc als Produkt der Arbutin-Hydrolyse noch glucosylierte Elongationsprodukte von Arbutin (hier nicht gezeigt). Die Nutzung von Arbutin als Donor durch AS ist als Ursache für das Absinken der Gesamtsumme der drei Arbutin-Konzentrationen also auszuschließen.

Die Bestimmung der molekularen Massen der erzeugten Produkte wurde freundlicherweise von Dr. Heinrich Steinmetz per LC-MS durchgeführt (2.8.13). Dabei wurden die Massen von Arb, Arb-G1 und Arb-G2 gefunden.

3.1.3.3. Akzeptor-Wirkung verschiedener Pufferkomponenten

Eine Inkubation von AS-Varianten (Zellextrakt, Herstellung siehe 3.3.4.1) mit Sac als einzigem Substrat in Gegenwart und Abwesenheit von Glycerin zeigte, dass in Anwesenheit von Glycerin der Hydrolyse-Anteil verringert und die Transfer-Aktivität erhöht war. Die Wiederholung der Aktivitätsmessung war zur Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse durchgeführt worden. Als einziger Unterschied zu den Bedingungen bei der ersten Messung war der AS-Lösung Glycerin zugesetzt worden, um eine Präzipitation bei der Lagerung zu verhindern (siehe 3.1.2.4). Die direkteste Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass Glycerin als Akzeptor wirkt. Diese Annahme wurde genauer untersucht. Aufgrund einer gewissen strukturellen Ähnlichkeit zu Glycerin wurden auch die anderen Hydroxylgruppen tragenden organischen Komponenten der AS-Lösung, Tris und DTT (siehe Abb. 21), als mögliche Akzeptoren getestet.



Standard-Reaktionen ohne Glycogen mit AS in Form von Zellextrakt, ergänzt mit 146 mM Glycerin, Tris oder DTT, wurden mit der Reaktion in Abwesenheit dieser Additive verglichen. Der Zusatz der drei Pufferkomponenten resultierte jeweils in einer Steigerung der Transfer-Aktivität (Tab. 22). Tris senkte die Hydrolyse-Aktivität leicht ab, erhöhte aber die Transfer-Aktivität nur circa halb so stark wie Glycerin und DTT. Bei DTT war eine leichte Erhöhung der Hydrolyse-Aktivität zu verzeichnen.

Tab. 22. Relative Aktivität von WT-AS (Zellextrakt) mit 146 mM Saccharose ± 146 mM Pufferkomponente

Relative Aktivität							Hydrolyse-Anteil [%]
Potentieller Akzeptor	Total		Tra		Hyd		
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
Ohne	116	4	-6 ¹⁾	2	122	5	105 ¹⁾
Glycerin	409	8	276	8	133	8	33
Tris	234	3	129	5	105	2	45
DTT	400	5	236	5	164	3	41

¹⁾ Aufgrund sehr geringer Messwerte kam es zu theoretisch nicht möglichen Werten.

Um die Frage zu klären, ob die Moleküle ohne zu reagieren auf die AS wirken oder ob sie selber als Akzeptoren dienen, wurde ein Langzeit-Versuch zur Sichtbarmachung möglicher Akzeptor-Produkte mit gereinigter AS durchgeführt.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS:	WT (ElectroTen-Blue/pJQA1000), gereinigt, 71,8 µg/ml
Donor-Substrat:	Saccharose [146 mM]
Zugesetzte Akzeptoren:	keine, Glycerin, DTT, Tris [je 146 mM]
Inkubationsdauer:	24 h
Analytik:	DC

Abb. 22 zeigt die zuckerhaltigen Reaktionsprodukte nach Auftrennung per DC. Bis auf den Ansatz Sac plus Tris wurde in allen Reaktionen die Sac komplett umgesetzt. Alle drei Ansätze mit Additiv zeigten leichte Veränderungen des Produktmusters gegenüber der Referenz ohne Additiv. Bei Glycerin-Zusatz waren neue Banden zwischen Maltotriose und Turanose sichtbar (Gly*). In Anwesenheit von Tris waren eine geringere Freisetzung von Glc und Fru sowie eine stärkere Bande mit der Mobilität von Turanose zu sehen. Eine geringere Hydrolyse-Aktivität bei Zusatz von Tris wurde bereits im Standard-Test (Tab. 22) verzeichnet und steht im Einklang mit der vergleichsweise verringerten Glc-Konzentration auf der DC. Eine erhöhte Turanosebildung (Übertragung eines Glc-Restes auf Fru) stimmt mit den verringerten Glc- und Fru-Mengen in der DC überein. Eine zusätzliche Bande, die auf glucosyliertes Tris hindeutete, wurde nicht beobachtet. Allerdings kann eine Überlagerung eines Tris-Glc-Produkts mit der Turanose nicht ausgeschlossen werden. Bei DTT-Zusatz entstanden zusätzlich drei schwache Banden oberhalb der Fru (DTT*). Eine erhöhte Turanosebildung (Übertragung eines Glc-Restes auf Fru) stimmt mit den verringerten Glc- und Fru-Mengen in der DC überein. Eine zusätzliche Bande, die auf glucosyliertes Tris hindeutete, wurde nicht beobachtet. Allerdings kann eine Überlagerung eines Tris-Glc-Produkts mit der Turanose nicht ausgeschlossen werden. Bei DTT-Zusatz entstanden zusätzlich drei schwache Banden oberhalb der Fru (DTT*).

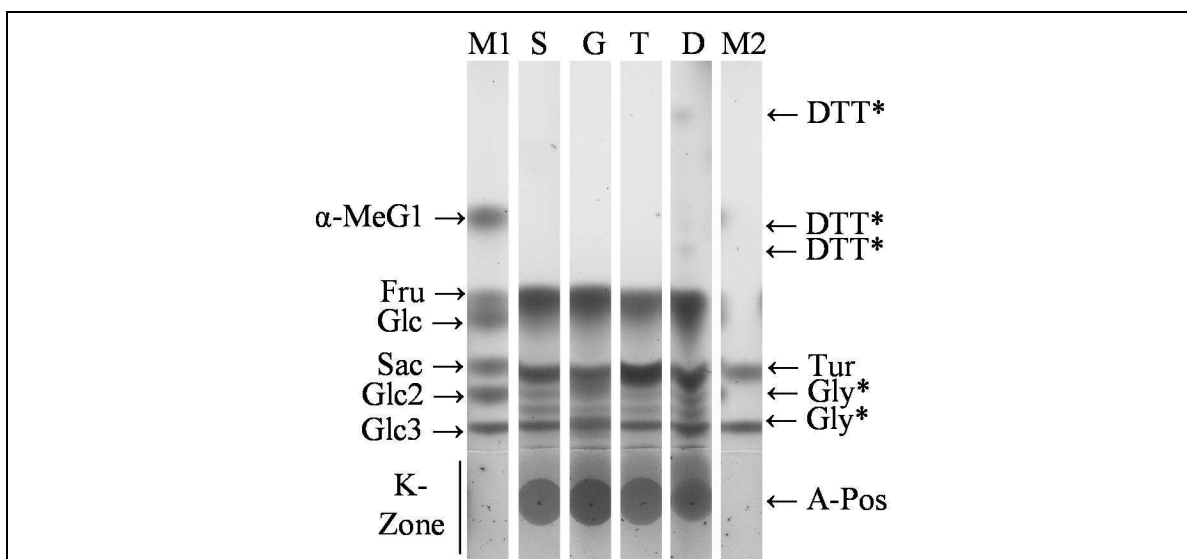


Abb. 22. DC-Analyse von Akzeptor-Produkten verschiedener Pufferkomponenten. Inkubation von aufgereinigter WT-AS für 24 h bei 30°C mit Saccharose als Donor und potentiellen Akzeptoren. Auftrennung von je 1,25 µl Probe (1:3 mit ddH₂O verdünnt) mit Ethylacetat/ Isopropanol/ H₂O (6:3:1, v/v/v). Bahnen: S = nur Sac. G = Sac + Glycerin, T = Sac + Tris, D = Sac + DTT. M1 und M2 = Marker. Stern = vermutlich glucosylierter Akzeptor.

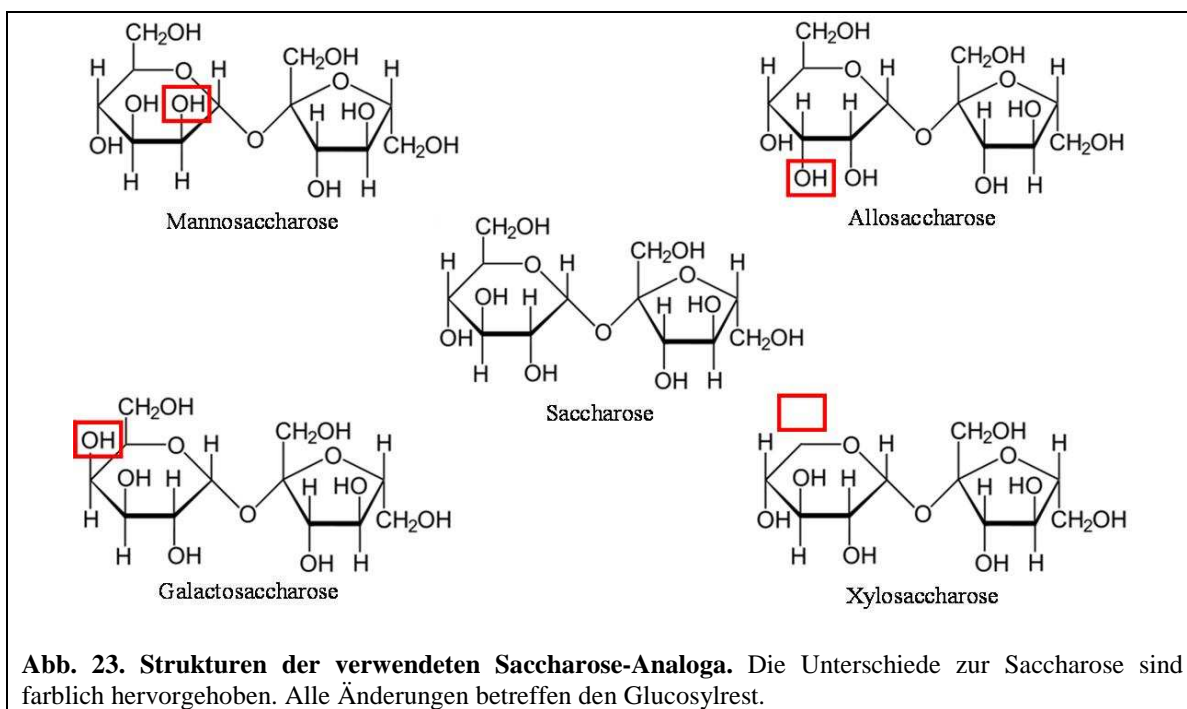
Die Reaktionsansätze wurden freundlicherweise von Dr. Heinrich Steinmetz per LC-MS analysiert. Für alle drei Additive wurden Produkte mit den Massen der einfach glucosylierten Produkte gefunden.

3.1.3.4. Umsatzversuche mit Saccharose-Analoga

Folgende Analoga der Sac wurden von Rafael Beine und Hendrik Hellmuth aus der AG von Herrn Prof. Buchholz am Institut für Technische Chemie der TU Braunschweig zur Verfügung gestellt:

1. Allosaccharose
2. Galactosaccharose
3. Mannosaccharose
4. Xylosaccharose

Die Substrate 1-3 unterscheiden sich von der Sac in der Stellung jeweils einer OH-Gruppe am Glc-Rest. Xylosac (4) fehlt das exocyclische C-Atom des Glc-Restes (Abb. 23).



3.1.3.4.1. Reinheit der Saccharose-Analoga

Die verfügbaren Sac-Analoga wurden vor ihrer Verwendung auf mögliche Verunreinigungen durch Zucker, die die Tests stören könnten, speziell Glc, Fru und Sac, untersucht. Für Mannosac, Galactosac und Xylosac wurden aufgrund der geringen verfügbaren Menge keine oder nur eingeschränkte Analysen durchgeführt. Tab. 23 zeigt die Ergebnisse der photometrischen Messung der Sac-, Glc- und Fru-Konzentrationen (siehe Kapitel 2.8.3).

Tab. 23. Konzentration von Glucose, Fructose und Saccharose in den Stammlösungen der verwendeten Saccharose-Analoga

Saccharose-Analogon (Chargen-Nr.)	Glucose [μ M]	Fructose [μ M]	Saccharose [μ M]	Konzentration der Stammlösung [mM]
Allosaccharose (Ch. 0002)	45,3 \pm 2,7	324 \pm 3	4180 \pm 250	350 \pm 10 ¹⁾
Allosaccharose (Ch. 7036)	< 20	11700 \pm 500	370 \pm 10	~1910 \pm 60 ¹⁾
Galactosaccharose (Ch. 0001)	< 50	~380	~5750	~500 ²⁾
Mannosaccharose	n.b.	n.b.	n.b.	~500 ²⁾
Xylosaccharose	n.b.	n.b.	n.b.	~975 ²⁾

¹⁾ nach Substrat-Hydrolyse und Messung der entstehenden Glucose (siehe Kapitel 2.8.9).

²⁾ laut Einwaage.

n.b. Nicht bestimmt.

Alle Stammlösungen wurden auch per DC analysiert. Neben der Bande des Sac-Analogons fand sich bei Allosac eine schwache Bande mit der Mobilität von Sac bei Ch. 0002 und mit der Mobilität von Fru bei Ch. 7036, übereinstimmend mit den photometrischen Messungen. Zusätzlich zeigten sich bei den zuletzt genannten Chargen noch zwei schwache Banden zuckerhaltiger Substanzen unbekannter Struktur. Durch Verdünnung der Stammlösung wurde die Konzentration des Substrats in der enzymatischen Reaktion so eingestellt, dass eine mögliche Produktbildung durch eine Verunreinigung bei Analyse per DC unsichtbar blieb. Bei Spots von Monosacchariden galt dabei eine Detektionsuntergrenze von etwa 0,25 mM, bei Disacchariden von ca. 0,13 mM.

3.1.3.4.2. Saccharose-Analoga als Substrate

Alle vier Analoga wurden zunächst durch eine Substrat-sparende Analyse per DC getestet. Der Umsatz der verwendeten Substrat-Analoga wurde über die Intensität der Substratbanden auf der DC getestet. Um eine sichtbare Abnahme der Bandenintensität auch bei geringem Umsatz leichter erkennen zu können, wurde die Substrat-Konzentration klein gewählt (0,25 bzw. 0,4 mM). Der dabei in Kauf genommene Nachteil ist eine herabgesetzte Reaktionsgeschwindigkeit.

Da Glycogen mit Sac als Donor als exzellenter Akzeptor wirkt, wurde der Umsatz in Anwesenheit dieses Substrats durchgeführt. Da die Höhe der Aktivierung auch von der Konzentration des Donors abhängt [40], wurde daher zunächst diejenige Glycogen-Konzentration ermittelt, die für die verwendete Substrat-Konzentration die höchste Steigerung der Aktivität ergab. Als Substrat diente in diesem Vorversuch Sac. Der Wert von 0,5 g/l Glycogen für eine Substrat-Konzentration von 0,25 mM wurde danach für beide Analoga-Konzentrationen (0,25 und 0,4 mM) übernommen.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS:	WT (BL21*(DE3)/pJEA1000), gereinigt, 28,5 U/ml bzw. 2,32 mg/ml, 50 % (v/v)
Potentieller Donor:	Allo-/Manno- [0,25 mM] sowie Galacto-/Xylosaccharose je [0,4 mM]
Zugesetzter Akzeptor:	Glycogen [0,5 g/l]
Komponenten der AS-Lösung ¹⁾ :	Glycerin [685 mM], Tris [25 mM], DTT [0,5 mM]
Inkubationsdauer:	42 h
Analytik:	DC

¹⁾ Erwähnt sind solche, die ebenfalls als Akzeptor wirken können (siehe Kapitel 3.1.3.3.3).

Die Aktivität mit 0,25 mM Sac und 0,5 g/l Glycogen betrug in etwa 1500 U/g. Die eingesetzte Enzymmenge würde in 42 h unter Standardbedingungen idealerweise (kein Aktivitätsverlust durch Inaktivierung) eine rund 9 M Sac-Konzentration umsetzen. Selbst eine 36000-fach geringere Reaktionsgeschwindigkeit würde demnach noch zu einem Komplettumsatz von 0,25 mM Donor-Substrat führen.

Unter den angewandten Bedingungen konnte kein Umsatz der Sac-Analoga festgestellt werden.

In chronologisch später durchgeführten weiteren Versuchen mit Allosac konnte dagegen ein Umsatz mit diesem Substrat (siehe 3.1.3.4.3) beobachtet werden. Die ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit war etwa 360-fach geringer als bei Sac (siehe Tab. 24). Das heißt, die hier verwendeten Versuchsbedingungen verursachten zusätzlich eine über 100-fache Verringerung dieser ohnehin geringen Reaktionsgeschwindigkeit, so dass kein sichtbarer Umsatz mehr festgestellt werden konnte.

Arbutin wurde nicht in die Reaktion eingesetzt, da auch die Eigenschaften dieses Akzeptors (siehe 3.1.3.3.1 und 3.1.3.4.4) zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt waren.

3.1.3.4.3. Allosaccharose als Substrat

Bei Allosac wurde in den oben erwähnten weiteren Vorversuchen UV-photometrisch ein Umsatz durch AS in Form von Zellextrakt nachgewiesen und zusätzlich per DC sichtbar gemacht. Die Entstehung von zwei Banden mit der Mobilität von Fru und All wies auf einen Umsatz (Hydrolyse) des Substrat-Analogons hin. Zwar hatte All dieselbe Laufstrecke wie Glc, doch konnte aufgrund der Intensität der angefärbten Produkte ausgeschlossen werden, dass es sich ausschließlich um Glc aus der Sac-Verunreinigung des Substrats handelt. Zur Erhärtung des Ergebnisses wurde der Versuch mit gereinigter AS wiederholt und sowohl photometrisch als auch per DC analysiert.

Mit Galactosac konnte in Vorversuchen UV-photometrisch kein Umsatz mit AS in Form von Zellextrakt nachgewiesen werden. Wegen unzureichender Substrat-Verfügbarkeit war dieser Nachweis mit Manno- und Xylosac nicht möglich. Daher wurden mit diesen drei Analoga keine weiterführenden Experimente durchgeführt.

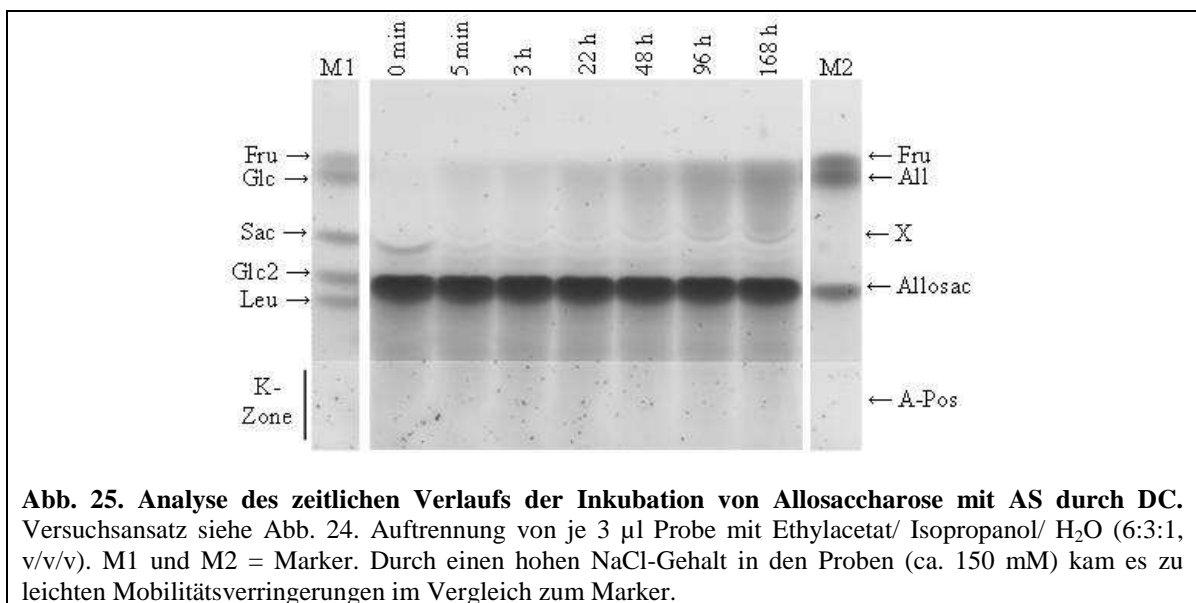
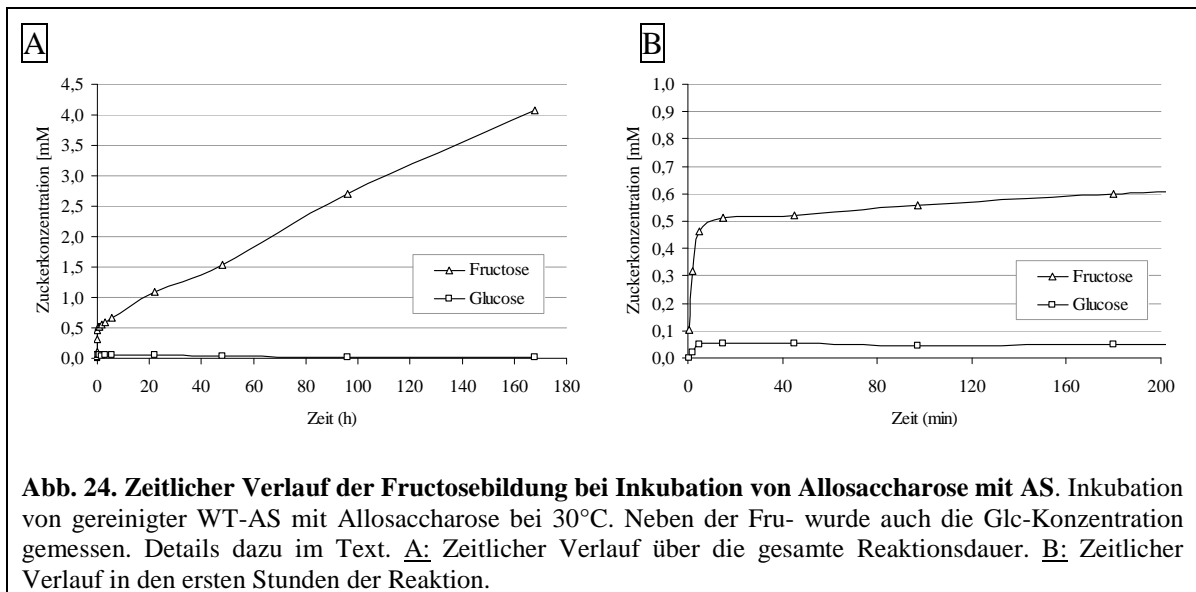
Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS:	WT (BL21*(DE3)/pJEA1000), gereinigt, 5,3 U/ml bzw. 430 µg/ml, 50 % (v/v) Proteinlösung
Donor-Substrat:	Allosaccharose (Ch. 0002) [35 mM]
Komponenten der AS-Lösung ¹⁾ :	Glycerin [685 mM], Tris [25 mM], DTT [0,5 mM]
Inkubationsdauer:	168 h
Analytik:	UV-photometrisch (340 nm) und DC

¹⁾ Erwähnt sind solche, die ebenfalls als Akzeptor wirken können (siehe Kapitel 3.1.3.3.3).

Der zeitliche Verlauf der Fru-Konzentration in Abb. 24 kann grob in zwei Abschnitte unterteilt werden: Einem sprunghaften Anstieg zu Beginn der Reaktion folgte eine langsamere, gleichmäßig schnelle Zunahme der Fru-Konzentration nach etwa 5 min Reaktionsdauer. Dieser Verlauf resultierte höchstwahrscheinlich durch den anfänglichen schnelleren Umsatz der als Verunreinigung vorliegenden Sac in der Allosac-Stammlösung und der (nach Sac-Verbrauch) anschließenden langsameren Fru-Bildung durch die Umsetzung von Allosac. Die gute Übereinstimmung zwischen der Fru-Menge aus Sac- und Fru-Verunreinigungen im Reaktionsansatz (siehe Tab. 23) von zusammen ca. 0,42 mM und der hier gemessenen Fru-Menge von ca. 0,5 mM zum Zeitpunkt der

Änderung der Bildungsgeschwindigkeit stützt diese Annahme. Die Glc-Konzentration lag nach 5 min gleich bleibend niedrig bei ca. 0,04 mM. Bei vollständiger Hydrolyse der Sac wäre eine maximale Menge von 0,42 mM möglich gewesen, ca. 90 % der Glc-Einheiten wurden demnach wahrscheinlich auf Glc transferiert. Auch im DC in Abb. 25 sieht man, dass die schwache Sac-Bande bereits nach 5 min Reaktionszeit vollständig verschwunden war. Ferner ist eine langsame aber deutliche Zunahme von Banden der Mobilität von Fru und All sichtbar. Eine langsamer laufende Bande (X, Abb. 25) könnte ein All-Akzeptor-Produkt sein.



Nachdem festgestellt worden war, dass Allosac durch AS umgesetzt wird, wurde die Umsatzgeschwindigkeit im Vergleich zum „natürlichen“ Donor-Substrat Sac ermittelt.

Aufgrund der vergleichsweise niedrigen Umsatzrate mit Allosac wurden eine große Enzymmenge und eine lange Reaktionsdauer zur messbaren Freisetzung von Fru benötigt. Die hohe Enzym-Konzentration führte allerdings beim Donor-Substrat Sac bereits nach 2 von 6 h Reaktionsdauer zu einem Komplettumsatz. Daher wurde für Sac eine geringere Enzymmenge eingesetzt und das fehlende Volumen mit Aufbewahrungspuffer 1 aufgefüllt.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen		
		<div>Saccharose</div> <div>Allosaccharose (Ch. 0002)</div>
Donor-Substrat:		35 [mM]
AS:	WT (BL21*(DE3)/pJEA1000), gereinigt	35 [mM] 450 [µg/ml]
Komponenten der AS-Lösung ¹⁾ :	Tris [je 25 mM], DTT [je 0,5 mM] sowie Glycerin	9,1 [mM]
Inkubationsdauer:	6 h	685 [mM]
Analytik:	UV-photometrisch (340 nm)	

¹⁾ Erwähnt sind solche, die ebenfalls als Akzeptor wirken können (siehe Kapitel 3.1.3.3.3).

Aufgrund des viel größeren Volumens von Enzymlösung bei der Allosac-Reaktion war dort auch der Glycerinanteil viel höher. Die Konzentration von Glycerin in den beiden Reaktionen wurde nicht angeglichen, da zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war, dass Glycerin als Akzeptor für AS dienen kann (siehe Kapitel 3.1.3.3.3). Eine Steigerung der Transfer-Aktivität durch Glycerin ist auch beim Umsatz von Allosac nicht auszuschließen.

Tab. 24. Spezifische Aktivität von Saccharose und Allosaccharose mit AS

Substrat	Spezifische Aktivität [U/g]
Saccharose	300 ± 6
Allosaccharose	0,82 ± 0,05

Für die Berechnung der Aktivitäten in Tab. 24 wurde für beide Reaktionen der Bereich des linearen Anstiegs der Fru-Konzentration zwischen 20 und 360 min gewählt. Der Kurvenverlauf glich erwartungsgemäß dem in Abb. 24. Mit Sac als Substrat wurde trotz einer 75-fach niedrigeren Enzymmenge in der gleichen Zeit etwa 5x mehr Fru freigesetzt. Die spezifische Aktivität war etwa 360x höher als mit Allosac.

3.1.3.4.4. Allosaccharose-Umsatz in Gegenwart von potentiellen Akzeptoren

Die Allosac-Reaktion wurde in Gegenwart verschiedener potentieller Akzeptor-Moleküle zur Ermittlung einer möglichen Trans-Allosylierung durch AS durchgeführt.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen	
AS:	WT (BL21*(DE3)/pJEA1000), gereinigt, 5,25 U/ml bzw. 450 µg/ml, 50 % (v/v) Proteinlösung
Donor-Substrat:	keins bzw. Allosaccharose (Ch. 7036) [60 mM]
Zugesetzte potentielle Akzeptoren:	siehe Kasten unten [je 50 mM]
Komponenten der AS-Lösung ¹⁾ :	Glycerin [685 mM], Tris [25 mM], DTT [0,5 mM]
Inkubationsdauer:	48 h
Analytik:	DC

¹⁾ Erwähnt sind solche, die ebenfalls als Akzeptor wirken können (siehe Kapitel 3.1.3.3.3).

Dazu wurden hauptsächlich Mono- und Disaccharide (siehe Kasten Seite 64) in Gegenwart von Allosac mit AS inkubiert, da die Übertragung auf einen Zucker als Empfänger am wahrscheinlichsten erschien, sowie weitere kleine Moleküle mit

zuckerähnlichen Strukturen. Die Möglichkeit, dass einige Akzeptoren selbst als Donor-Substrat fungieren, wurde durch deren Inkubation mit AS in Abwesenheit von Allosac getestet.

Als Akzeptoren für Allosylierung getestete Verbindungen:

D-Allose	D-Gentiobiose	D-Leucrose
L-Arabinose	D-Glucosamin · HCl	D-Melibiose
L-Arabitrol	D-Glucose	D-Saccharose
Arbutin	myo-Inositol	L-Sorbose
D-Cellobiose	D-Isomaltose	D-Trehalose
D-Fructose	D-Lactose	D-Turanose
D-Galactose	D-Lactulose	D-Xylose

Tatsächlich konnte bei einer der getesteten Substanzen, Arbutin, ein Akzeptor-Produkt auf der DC identifiziert werden (siehe Abb. 26). Bei Inkubation ohne Allosac oder ohne Arbutin war diese Bande nicht sichtbar. Arb-All weist fast die gleiche Mobilität wie Arb-Glc auf (vergleiche Abb. 18). Eine Bande von zweifach allosyliertem Arbutin (mit vergleichbarer Mobilität wie Arb-Glc2) war nicht erkennbar.

Die ebenfalls stattfindende Übertragung von Glc aus der Sac-Kontamination wäre aufgrund der geringen Konzentration der Sac auf dem DC nicht nachweisbar gewesen. Die Konzentration der Sac-Verunreinigung war mit ca. 12 μ M über zehnmal geringer als die Nachweisgrenze für Disaccharide (zum Beispiel Sac oder Arb-G1). Die Intensitäten der Allose- (All) und auch der Fru-Bande waren beim Ansatz ohne Arbutin etwas höher als in dessen Gegenwart.

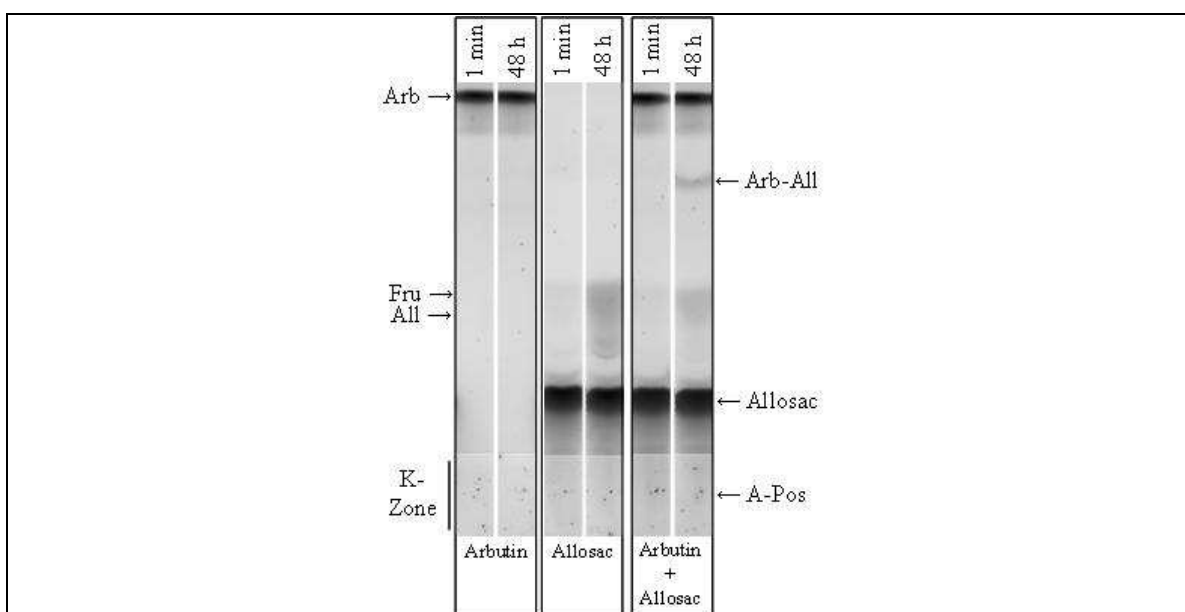


Abb. 26. DC-Analyse von Allosaccharose-Umsatz mit potentielltem Akzeptor Arbutin durch WT-AS. Inkubation von aufgereinigter WT-AS mit Allosac [60 mM] und/oder Arbutin [50 mM] bei 30°C für 48 h. Je 2,25 μ l Reaktionsgemisch wurden unverdünnt aufgetragen und mit Ethylacetat/ Isopropanol/ H₂O (6:3:1, v/v/v) aufgetrennt. Die Bahnen zeigen die Produkte von AS mit Arb (links), mit Allosac (Mitte) und mit der Kombination der beiden (rechts) jeweils zum Start (1 min) und am Ende der Reaktion (48 h). Arb-All = allosyliertes Arbutin.

3.2. Erzeugung und Charakterisierung von gezielten Varianten der Amylosucrase

Wie die beschriebenen Versuche gezeigt haben, war der WT der AS nicht oder nur sehr ineffizient in der Lage, im Glc-Teil substituierte Sac-Analoga als Glycosyl-Donoren zu nutzen. Daher sollten Varianten erzeugt werden, die bezüglich der Umsatzgeschwindigkeit und/oder des limitierten Donor-Substratspektrums deutliche Verbesserungen aufweisen.

3.2.1. Vorüberlegungen

Um herauszufinden, welche AA-Reste möglicherweise den Umsatz von Allo-, Manno- und Galactosac verhinderten, wurden *in-silico*-Analysen zur Positionierung dieser Sac-Analoga im Aktiven Zentrum der Kristallstrukturen der AS [36] durchgeführt. Diese wurde freundlicherweise von Dr. Hans-Jürgen Hecht ausgeführt. Die Analysen ergaben, dass nur Tyr147 eine sterische Interferenz mit den Analoga Mannosac und Galactosac zeigte. Deshalb wurde diese AA für gezielte Austausche ausgewählt. Interessanterweise wurde eine Interferenz mit Allosac nicht prognostiziert. Dies stimmt qualitativ mit der mit WT-AS gefundenen geringen Aktivität gegenüber diesem Sac-Analogen überein.

Tyr147 bildet ein wichtiges strukturelles Element in der Ausbildung des Bodens der Substrattasche im Aktiven Zentrum, indem es einen hydrophoben Puffer für den Glc-Rest des Substrats liefert. Stapelkräfte mit der aromatischen Ringstruktur („*stacking interaction*“) des Tyrosins tragen zur Bindung und korrekten Positionierung des Glc-Restes im Aktiven Zentrum bei (Abb. 27).

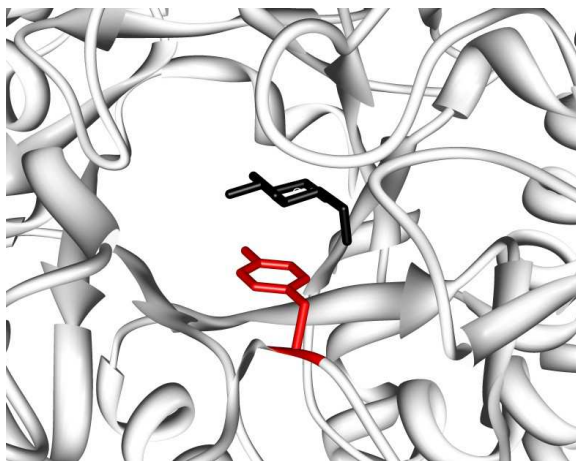
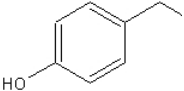

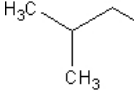
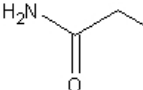
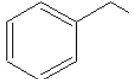
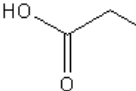
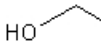
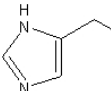
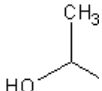


Abb. 27. Tyr147 (rot) im Aktiven Zentrum der AS im Komplex mit Glucose (schwarz). Der Übersichtlichkeit halber sind bis auf die Seitenkette von Tyr147 (rot) alle Aminosäuren auf die Ansicht der Sekundärstruktur-Elemente bzw. das Polymerrückgrat reduziert dargestellt. Der Glc-Rest ist schwarz gefärbt. Die Abbildung basiert auf der PDB-Struktur 1JG9 [35].

Da schwer vorhergesagt werden konnte, welcher Austausch des Tyr147 am ehesten zur gewünschten Änderung der Substratspezifität bei Erhaltung möglichst hoher enzymatischer Aktivität führt, wurde eine partielle Sättigungsmutagenese durchgeführt, wobei die AA147 durch acht Vertreter unterschiedlicher Seitenkettentypen ersetzt wurde.

Tab. 25 zeigt die Seitenketten der verwendeten AAn im Vergleich zum Tyrosin im WT-Enzym. Neben Tyrosin kommt natürlicherweise auch Phenylalanin in einigen Sequenzen der bislang entdeckten AS vor.

Tab. 25. Namen und Seitenketten der Aminosäuren, die an Position 147 der AS eingesetzt wurden.

Tyrosin (Wildtyp-AA)			
Alanin		Leucin	
Asparagin		Phenylalanin	
Asparaginsäure		Serin	
Histidin		Threonin	

3.2.2. Erzeugung und Analyse der mutierten AS-Gene

Die Erzeugung der Plasmide für die Austausch des Tyr147-Codons im AS-Gen erfolgte mit Hilfe von Oligonucleotiden. Details der Konstruktion wurden in Kapitel 2.4.2.4 beschrieben. Das Prinzip ist in Abb. 28 dargestellt. Eine singular vorkommende *DraI*-Schnittstelle lag so nah am Tyr147-Codon (ca. 30 bp), dass für PCRs Primer verwendet werden konnten, die sowohl das gewünschte Codon-147 als auch die *DraI*-Schnittstelle zur Ligation in die Empfänger-DNA enthielten. Dadurch konnte auf die Erzeugung von überlappenden Teilfragmenten (wie für die statistischen Varianten, Kapitel 3.2.4.4) verzichtet werden.

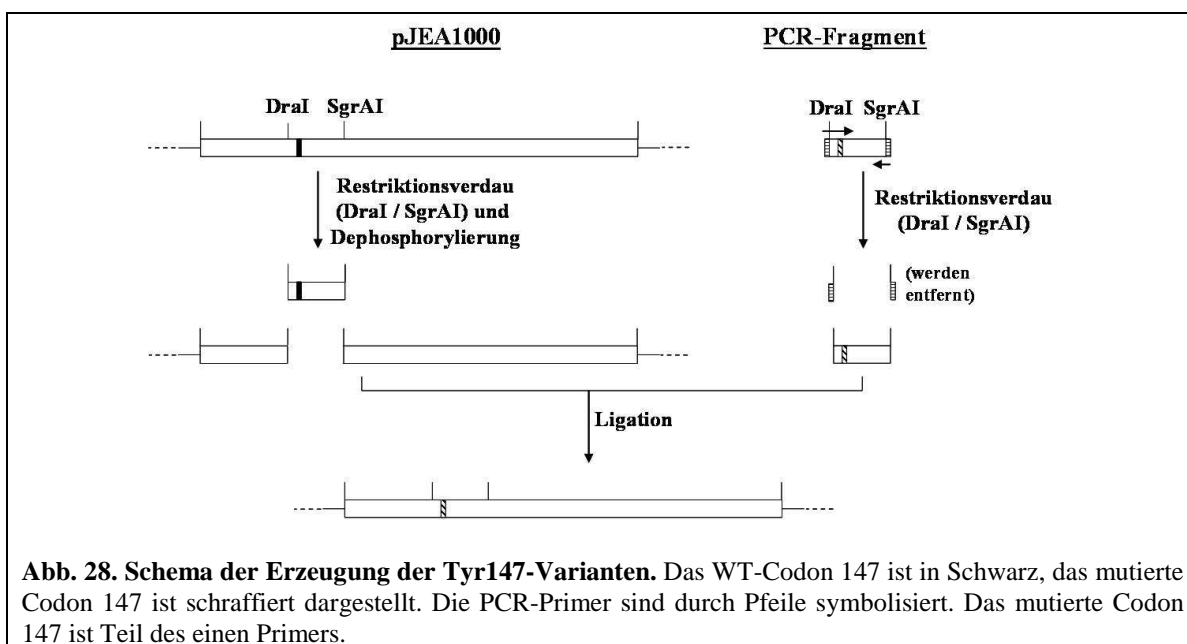


Abb. 28. Schema der Erzeugung der Tyr147-Varianten. Das WT-Codon 147 ist in Schwarz, das mutierte Codon 147 ist schraffiert dargestellt. Die PCR-Primer sind durch Pfeile symbolisiert. Das mutierte Codon 147 ist Teil des einen Primers.

Die Codons wurden unter Berücksichtigung der Codon-Häufigkeit in *E.-coli* ausgewählt [79], um eine möglichst optimale Translation zu erzielen.

Einige der neu einzuführenden Codons konnten so konzipiert werden, dass neue Restriktionsschnittstellen entstanden (siehe Tab. 26). Per Analyse mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurden Plasmide aus der Mutagenese zunächst vorgetestet, um so die Anzahl zu sequenzierender Plasmide zu verringern. Wo keine nutzbare Änderung von Restriktionsschnittstellen vorhanden war, wurden vier zufällig ausgewählte Plasmide sequenziert. Die Sequenzierung ergab für alle acht Varianten Plasmide mit 100 %iger Übereinstimmung der ausgetauschten Sequenz zum WT, ausschließlich der geänderten Codons.

Tab. 26. Nachweis des korrekten Codon-Austauschs in Tyr147-Varianten

Variante/ Codon	Nutzbares Restriktions- enzym	Anzahl Restriktions- analysen	Anzahl korrekter Schnittmuster	Anzahl sequenzierter Klone	korrekte Sequenzen
Leu147	<i>ScrFI</i>	8	6	1	1
Thr147	<i>SacII</i>	6	1	1	1
His147	<i>EaeI</i>	5	1	1	1
Ala147	<i>Hin6I</i>	10	3	3	2
Ser147	-	-	-	1	1
Asn147	-	-	-	2	2
Asp147	-	-	-	2	1
Phe147	-	-	-	5	2

3.2.3. Produktion und Aufreinigung der Proteine

Als Expressions-Stamm wurde wieder *E. coli* BL21*(DE3) genutzt. Die Höhe der Expression der Varianten war vergleichbar mit der des WT. Die Aufreinigung erfolgte wie für den WT in Kapitel 3.1.2.4 beschrieben. Allen Enzympräparationen wurde ein Anteil von 10 % (v/v) Glycerin zugesetzt.

3.2.4. Charakterisierung der Tyr147-Varianten

3.2.4.1. Spezifische Aktivität der Tyr147-Varianten im Standard-Test

Die Charakterisierung der Varianten erfolgte unter den gleichen Versuchsbedingungen wie für das WT-Enzym. Aktivitätsbedingt war das eingesetzte Volumen der Enzym-lösungen teilweise verschieden, was dementsprechend auch eine unterschiedliche Glycerin-Konzentration zur Folge hatte. Die Ergebnisse für die Varianten müssen deshalb unter Berücksichtigung dieser Tatsache gewertet werden. Bei einer Glycerin-Konzentration von 45 mM (entspricht in etwa der Konzentration der Varianten His147 bis Ser147 in Tab. 27) beträgt z. B. die Steigerung der Total-Aktivität im Standard-Test ca. 8 %, die der Tra-Aktivität etwa 3 % (interpoliert aus Tab. 22, WT-Werte). Der Hydrolyse-Anteil wird dagegen im Standard-Test durch das Glycerin nicht signifikant verringert.

Die Versuchsbedingungen bei der Ermittlung der spezifischen Aktivität entsprachen im Prinzip denen mit dem WT aus Kapitel 3.1.3.1.2. Die Proteinpräparationen stammten jedoch, anders als in 3.1.3.1.1, aus BL21*[DE3](pJEA1000). Ferner enthielten die AS-Lösungen andere Komponenten (Glycerin, Tris, DTT), die ebenfalls als Akzeptor wirken können (siehe Kapitel 3.1.3.3.3).

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS	WT und Tyr147-Varianten (BL21*(DE3)/pJEA1000), gereinigt, ca. 30 mU/ml
Donor-Substrat:	Saccharose [146 mM]
Zugesetzter Akzeptor:	Glycogen [0,1 g/l]
Komponenten der AS-Lösung ¹⁾ :	Glycerin, Tris, DTT (siehe Tab. 27; das molare Verhältnis der drei Substanzen betrug stets 1370:50:1)
Inkubationsdauer:	15 min
Analytik:	UV-photometrisch (340 nm)

¹⁾ Erwähnt sind solche, die ebenfalls als Akzeptor wirken können (siehe Kapitel 3.1.3.3.3).

Die Ergebnisse (Tab. 27) zeigen, dass alle Varianten noch Aktivität aufweisen. Die Werte liegen aber bis zu 1000-fach unter dem des WT, was die kritische Rolle von Tyr147 im katalytischen Prozess belegt. Die höchste Aktivität bleibt bei Substitution durch andere aromatische Seitenketten (Phenylalanin, Histidin) sowie überraschenderweise durch Alanin erhalten.

Tab. 27. Spezifische Aktivität der AS-Varianten mit 146 mM Saccharose und 0,1 g/l Glycogen. Die Enzyme sind in etwa nach Gesamtaktivität geordnet.

AS-Variante	Spezifische Aktivität [U/g]						Hydrolyse-Anteil [%]	Glycerin-Konzentration [mM]
	Total		Tra		Hyd			
	MW	SA	MW	SA	MW	SA		
WT	12300	419	11700	353	574	39	4,68	1,0
Phe147	9720	273	9640	265	78	16	0,80	1,8
His147	601	16	596	17	5,46	1,61	0,91	43
Ala147	628	14	626	13	2,17	0,67	0,35	46
Asn147	294	3	293	3	1,40	0,57	0,48	49
Leu147	248	22	246	22	1,01	0,55	0,41	46
Ser147	69,5	0,8	68,9	0,7	0,60	0,60	0,86	46
Asp147	53,1	2,1	52,2	2,2	0,92	0,06	1,73	91
Thr147	12,2	0,05	11,4	0,04	0,77	0,00	6,31	137

3.2.4.2. Polymerbildung

Der Nachweis der Bildung Amylose-artiger Polymere wurde *in vivo* wie in Kapitel 3.1.2 auf festem LB-Medium, ergänzt mit Sac, durch Iodfärbung durchgeführt (siehe Abb. 29).

Die Färbung war beim WT und Variante Phe147 am stärksten, mit deutlichen Höfen um die Zellen. Varianten His, Ala, Asn, Leu und Ser147 zeigten schwächere Färbungen und nur innerhalb der Zellen. Die Varianten Thr und Asp147 zeigten nur sehr schwach sichtbare Färbung innerhalb der Zellen. *E. coli* BL21*(DE3)-Wirtszellen ohne AS-Gen waren nicht gefärbt. Damit ergab sich eine grobe Übereinstimmung mit den spezifischen Aktivitäten von WT-AS und Varianten im Standard-Test (Tab. 27).

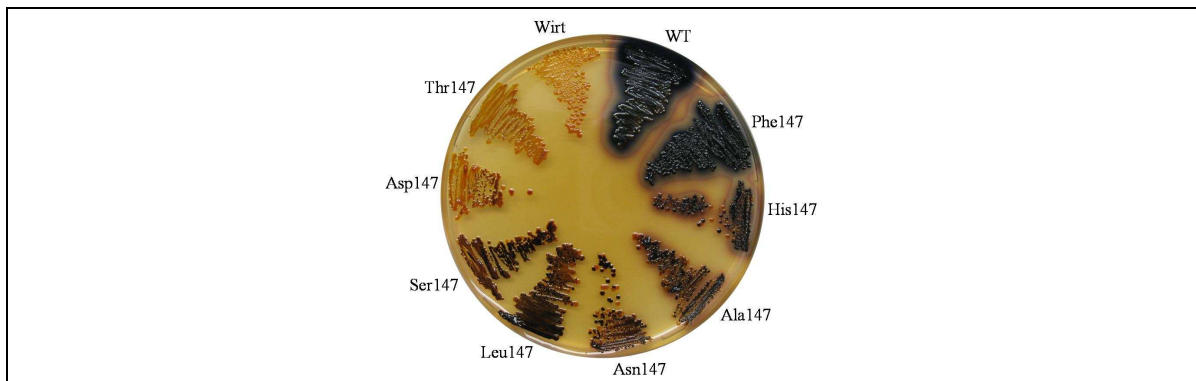


Abb. 29. Nachweis von durch Tyr147-Varianten und Wildtyp-AS gebildetem Polymer *in vivo*. Die entsprechenden *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agar mit 5 % (w/v) Saccharose-Anteil über Nacht bei 37°C mit IPTG [0,4 mM in Endkonzentration] im Medium inkubiert. Die Detektion von anfärbbarem Polymer erfolgte durch kristallines I₂, welches in fester Form in den Deckel der umgedrehten Petrischale gestreut wurde. Wirt = *E. coli* BL21*[DE3] (pET-33b(+))S).

3.2.4.3. Umsatzversuche mit Saccharose-Analoga

Eine mögliche Änderung der Donor-Substratspezifität wurde für alle acht Varianten mit den Sac-Analoga Allo-, Galacto-, Manno- und Xylosac untersucht. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen mit WT-AS aus Kapitel 3.1.3.4.2.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS:	Tyr147-Varianten (BL21*(DE3)/pJEA1000), gereinigt, 0,014 bis 13,8 U/ml bzw. 0,64 bis 1,42 mg/ml, 50 % (v/v)
Potentieller Donor:	Allo-/Manno- [0,25 mM] sowie Galacto-/Xylosaccharose je [0,4 mM]
Zugesetzter Akzeptor:	Glycogen [0,5 g/l]
Komponenten der AS-Lösung ¹⁾ :	Glycerin [685 mM], Tris [25 mM], DTT [0,5 mM]
Inkubationsdauer:	42 h
Analytik:	DC

¹⁾ Im Reaktionsansatz enthaltene Substanzen, die als Akzeptor wirken können (siehe Kapitel 3.1.3.3.3).

Unter den gewählten Bedingungen konnte mit keiner der acht Varianten und keiner der vier Substanzen ein Umsatz beobachtet werden.

3.2.4.4. Stimulierbarkeit der Aktivität der Tyr147-Varianten durch steigende Glycogen-Konzentrationen

Die Substitution von Tyr147 kann theoretisch sowohl den Angriff von Asp286 auf Sac als auch den Angriff eines Akzeptors auf das AS-Glc-Intermediat beeinflussen. Beim WT ist zumindest bei gebräuchlichen Akzeptor-Konzentrationen der erste Teilschritt viel schneller als der zweite, was sich zum Beispiel in einer signifikanten Erhöhung der Geschwindigkeit der Gesamtreaktion durch steigende Glycogen-Konzentration zeigt. Um dies für die Varianten zu verifizieren, wurde analog zum WT-Enzym der Einfluss von Glycogen auf die spezifische Aktivität untersucht. Aufgrund ihrer relativ geringen spezifischen Aktivitäten wurde auf eine Untersuchung der Varianten Thr147, Asp147 und Ser147 verzichtet. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen aus Kapitel 3.2.4.1,

jedoch mit bis zu 10,0 g/l Glycogen in der Reaktion. Dargestellt sind nur die Werte der Transfer-Reaktion, da bereits bei 0,1 g/l Glycogen in der Reaktion die Absorptionswerte für die Hydrolyse-Reaktion zu klein für eine verlässliche Aussage waren.

Die Ergebnisse (Abb. 30) zeigen, dass alle Varianten ein ähnliches Verhalten bei der Aktivierung durch Glycogen aufwiesen. Alle ließen sich durch Glycogen-Zugabe in ihrer Aktivität steigern. Die Transfer-Aktivität stieg von 0,0 bis 1,0 g/l Glycogen stark an und ging dann in ein Plateau über. Der größte Anstieg erfolgte beim Schritt von 0,0 auf 0,1 g/l (Steigerung um Faktor 50 bis über 200).

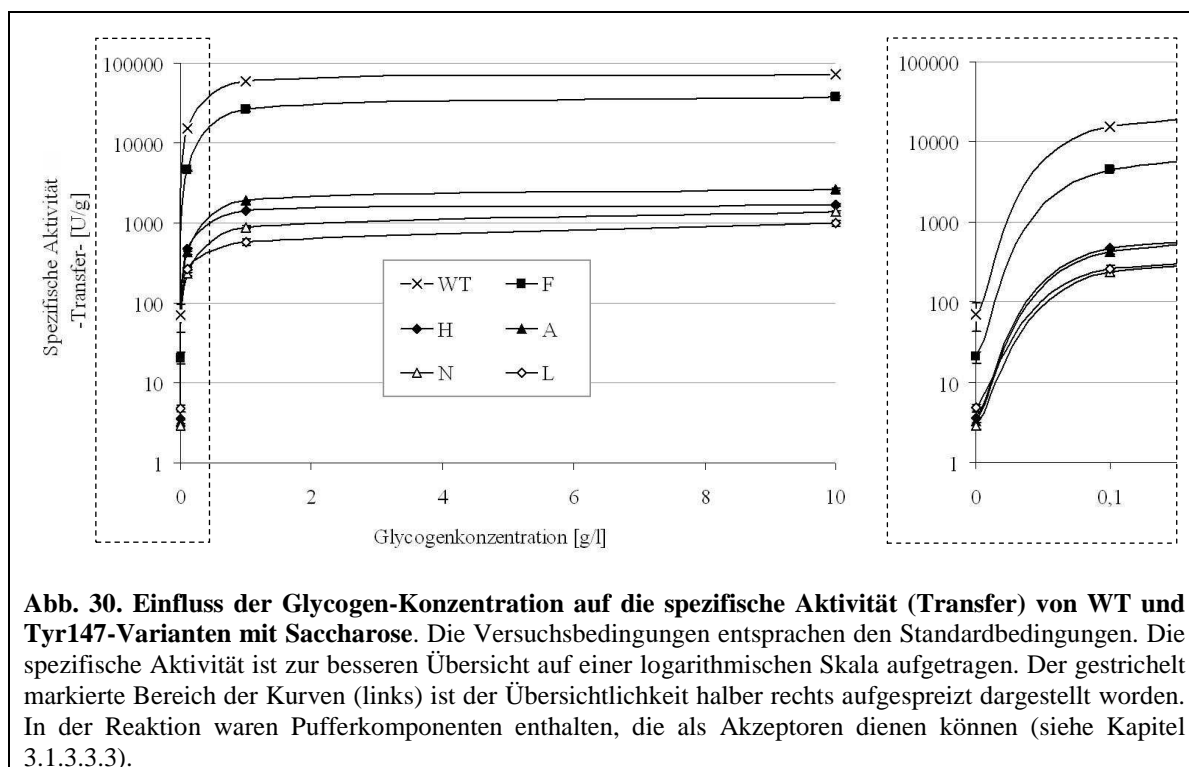


Abb. 30. Einfluss der Glycogen-Konzentration auf die spezifische Aktivität (Transfer) von WT und Tyr147-Varianten mit Saccharose. Die Versuchsbedingungen entsprachen den Standardbedingungen. Die spezifische Aktivität ist zur besseren Übersicht auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. Der gestrichelt markierte Bereich der Kurven (links) ist der Übersichtlichkeit halber rechts aufgespreizt dargestellt worden. In der Reaktion waren Pufferkomponenten enthalten, die als Akzeptoren dienen können (siehe Kapitel 3.1.3.3.3).

Die Variante Leu147 zeigte die insgesamt geringste Aktivierung (ca. Faktor 200 bei 10 g/l), jedoch den höchsten Faktor bei Steigerung von 1,0 auf 10,0 g/l Glycogen (siehe Tab. 28). Den höchsten Anstieg verzeichnete die Variante Phe147.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei 146 mM Sac auch bei allen Tyr147-Varianten der erste Teilschritt der Reaktion wesentlich schneller ist als der zweite. Allerdings unterscheiden sich die Varianten in der Erhöhung der Gesamtgeschwindigkeit der Reaktion durch Akzeptor-Zusatz fast bis um den Faktor 10 (Phe147, Leu147).

Tab. 28. Relative Aktivität und Faktor der Aktivierung der Transfer-Reaktion von AS bei 146 mM Saccharose bei Zugabe von verschiedenen Glycogen-Konzentrationen.

Variante	Relative Aktivität (Transfer)				Quotient der Aktivität bei verschiedenen Glycogen-Konzentrationen [g/l]			Glycerin-Konzentration [mM]
	Glycogen-Konzentration [g/l]							
	0,0	0,1	1,0	10,0	0,0 und 0,1	0,1 und 1,0	1,0 und 10,0	
WT	1	219	836	1020	219	3,8	1,22	1,0
Phe147	1	219	1270	1810	219	5,8	1,42	1,8
His147	1	133	410	481	133	3,1	1,17	43
Ala147	1	130	579	817	130	4,5	1,41	46
Asn147	1	82	311	482	82	3,8	1,55	49
Leu147	1	55	120	207	55	2,2	1,73	46

Wie aus Tab. 28 ersichtlich, wurde bei allen vier Glycogen-Konzentrationen für eine gegebene Variante das gleiche Volumen an Enzymlösung verwendet, so dass der Glycerinanteil immer gleich blieb. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivitäten der Varianten wurden jedoch die Enzym- und damit auch die Glycerin-Konzentrationen angepasst, um verlässliche Absorptionswerte zu erhalten.

3.3. Erzeugung und Charakterisierung von statistischen Varianten der Amylosucrase

3.3.1. Vorüberlegungen

Ein wesentliches Ziel der Arbeit lag in der Identifizierung und Modifizierung von AAn bzw. Peptidsegmenten mit Einfluss auf bestimmte katalytische Eigenschaften. Nachdem eine weitgehend rationale Vorgehensweise (Kapitel 3.2) für dieses Ziel wenig erfolgreich gewesen war, wurden nunmehr in ausgewählten Regionen statistische AA-Austausche durchgeführt.

Die Strategie bei der Erzeugung der statistischen Varianten bestand darin, eine bis mehrere AAn simultan in der ersten und/oder zweiten „Schale“ rund um die Substratbindungsstellen auszutauschen (siehe Abb. 31), um so Restrukturierungen des Aktiven Zentrums auszulösen.

Die Kennzeichnung der Monomer-Substratbindungsstellen, der so genannten *subsites* (in Abb. 31 und im Folgenden), in denen Donor- bzw. Akzeptor-Substrate gebunden werden können, folgt der Nomenklatur nach Davies *et al.* [80].

Die Beschränkung auf eine gezielte Auswahl von Regionen der AS wurde vorgenommen, da angenommen wurde, dass dadurch das Verhältnis von relevanten Varianten zur Zahl der insgesamt möglichen Varianten günstiger ist als bei einer Mutagenese des gesamten Gens. Ferner ist durch die Lage der Regionen in der Umgebung des Aktiven Zentrums eher eine Änderung von Substratspezifität oder Produktmuster zu erwarten, als durch einen Austausch von AAn an weiter entfernt gelegenen Positionen. Für diese Annahme sprechen auch Daten aus der Literatur [81].

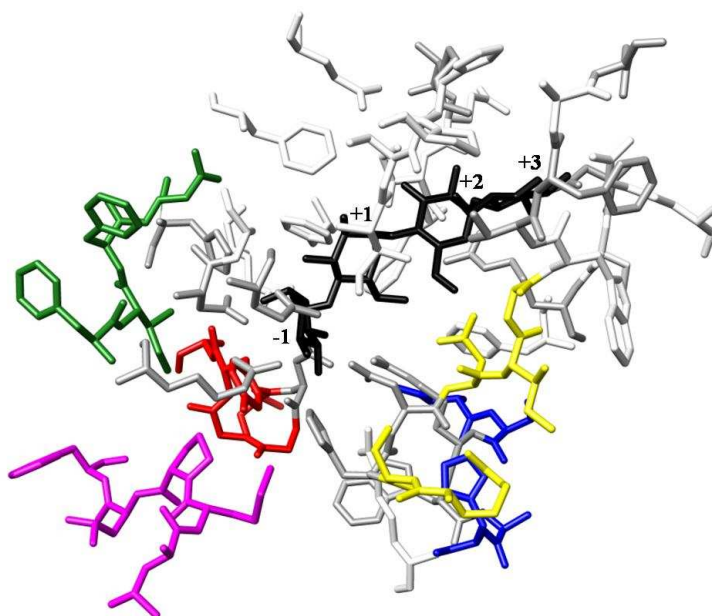


Abb. 31. Räumliche Struktur des Aktiven Zentrums der Amylosucrase mit Lage der zur Mutagenese ausgewählten fünf Regionen. Ein gebundenes Maltoheptaose-Molekül (schwarz, nur die ersten vier Glucose-Einheiten in *subsite* -1 bis +3 sind gezeigt) markiert die wahrscheinliche Bindestelle der wachsenden Glucankette. Die AAn der fünf Regionen sind farbig markiert: 1 (rot), 5 (gelb), 6 (blau), 7 (violett) und 9 (grün). Als für die katalytische Aktivität essentiell betrachtete und daher in dieser Arbeit nicht ausgetauschte AAn innerhalb der fünf Regionen sind nicht gefärbt. Die Abbildung basiert auf der PDB-Struktur 1MW0 [36].

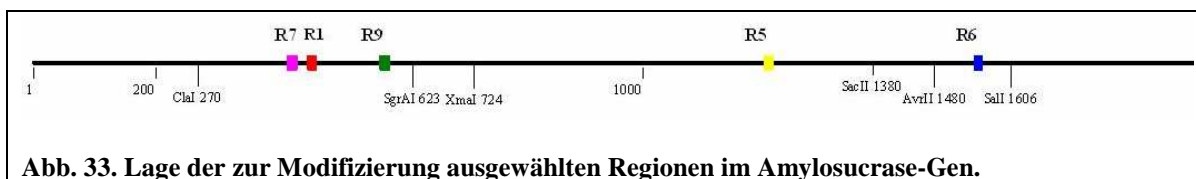
Insgesamt wurden fünf Regionen von jeweils vier bis sechs AAn ausgewählt. Die Bezeichnungen der Regionen gehen zum Teil auf die Bezeichnungen vergleichbarer Regionen der GtfR aus *Streptococcus oralis* aus vorangegangenen Arbeiten [24] zurück.

Aminosäuren, die auf Grund publizierter Daten [35,57,82] als essentiell für die Aktivität der AS angesehen wurden, wurden nicht ausgetauscht (siehe Abb. 31 und Abb. 32).

Region 7	Region 1	Region 9	Region 5	Region 6
132LMPLF ₁₃₆	143SDGGYA ₁₄₈	183FIFN ₁₈₆	390RSHDDIG ₃₉₆	507DSRWAH ₅₁₂
-	[-1], -1	-	[-1], +1, +2	[-1]

Abb. 32. AA-Sequenzen und Positionen der zur Mutagenese ausgewählten Regionen in der Amylosucrase. Die Nummerierung der AAn bezieht sich auf die 628 AAn große AA-Struktur aus PDB-Eintrag 1MW0 [36]. Unterstrichene AAn wurden nicht verändert. Die Nummern der *subsites*, in denen direkte Wechselwirkungen der angegebenen AAn mit den Glc-Einheiten der Maltoheptaose stattfinden (vergl. Abb. 31), sind unterhalb der Sequenzen angegeben. Bei WW mit nicht veränderten AAn sind diese *subsites* in eckige Klammern gesetzt.

Die Abb. 33 macht deutlich, welche unterschiedlichen Positionen die einzelnen Regionen in der Nucleotid-Sequenz des AS-Gens innehaben. Daher mussten sie in der Regel separat mutagenisiert werden. Ebenfalls angegeben sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme für den Austausch der mutagenisierten Segmente.



Neben Variantenbanken einzelner Regionen wurden auch Banken aus Kombinationen von zwei oder drei variierten Regionen hergestellt. Für die Kombinationen wurden geringere Mutationsraten in den einzelnen Regionen gewählt, um die Gesamtsumme der AA-Austausche nicht derart groß werden zu lassen, dass die Banken kaum noch aktive Varianten enthalten.

3.3.2. Erzeugung und Analyse von Banken regional mutierter AS-Gene

3.3.2.1. Statistische Änderung der Nucleotid-Sequenz mittels degenerierter Oligonucleotide

Für die Einführung von statistischen Änderungen im AS-Gen wurden PCR-Produkte mit degenerierten Oligonucleotiden hergestellt. Über geeignete Restriktionsschnittstellen an den beiden Enden eines DNA-Fragments lässt sich ein Genabschnitt einfach in einem Empfänger-Gen austauschen. Aufgrund des Fehlens nutzbarer Restriktionsschnittstellen in direkter Nähe der mutagenisierten Region, war es meist notwendig, das mutagenisierte Segment (enthält die eine Schnittstelle) mit einem Hilfsfragment (enthält die zweite notwendige Schnittstelle) per OE [66] zu fusionieren. Zu diesem Zweck besaßen die Fusionspartner einen kurzen, überlappenden Sequenzabschnitt (11-18 bp). Diese Überlappungsregion reicht aus, damit sich hinreichend stabile Hybride während der OE-Reaktion ausbilden. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wurden dann die Gegenstränge der einzelnen Teilfragmente auf der gesamten Länge des Fragments synthetisiert. Die

optimale Hybridisierungstemperatur, um Fusionsprodukte mit korrekter Länge zu erhalten, wurde experimentell ermittelt. In einem anschließenden PCR-Schritt erfolgte die Vervielfältigung der Fusionsprodukte (siehe Abb. 4). Durch die Aufteilung in zwei Teilschritte sollte erreicht werden, dass möglichst alle Fusionprodukte die gleiche Anzahl von PCR-Zyklen durchlaufen. Fusionsprodukte (und damit individuelle Mutationen), die bereits zu Beginn der PCR gebildet worden wären, würden sonst häufiger amplifiziert werden als solche, die sich erst in späteren PCR-Zyklen bilden.

Die Ligation der Fusionsprodukte in das Rezipientenplasmid erfolgte, wie erwähnt, über Restriktionsschnittstellen. Um eine möglichst hohe Zahl von Transformanden zu erzielen, wurden hochkompetente Zellen von *E. coli* ElectroTen-Blue mit den Ligationsprodukten elektrotransformiert. Von der Zellsuspension der Transformation wurden zur Ermittlung der Anzahl von Transformanden je Milliliter Zellsuspension sowie der Mutationsrate und -verteilung im AS-Gen Aliquots ausplattiert.

Die degenerierten Oligonucleotide waren so konzipiert, dass an jeder Position eines zu ändernden Codons die drei Nicht-WT-NT mit denselben Prozentanteilen vorkommen sollten. Die Summen dieser Anteile sind in Tab. 29, Spalte 3 aufgeführt. Auf der Grundlage dieser Werte wurden für die einzelnen Regionen die in Tab. 29 gezeigten Mittelwerte für Nucleotid- bzw. Aminosäure-Austausche berechnet.

Tab. 29. Erwartete Charakteristika der erzeugten Variantenbanken

Oligo-nucleotid	Variierte AA-Seq. ¹⁾	Anteil Mutationen pro mutagenisierter Position ²⁾ [%]	Anzahl Substitutionen pro Klon		Anteil WT-Klone [%]		Geschätzte AA-Diversität der Bank
			NT	AA	NT	AA	
1L	¹⁴³ <u>SDGGYA</u> ₁₄₈	9	1,35	1,0	24,3	34,8	35
5H-I ³⁾	³⁹⁰ <u>RSHDDIG</u> ₃₉₆	21	3,15	2,4	2,91	7,4	2700
5H-II	³⁹⁰ <u>RSHDDIG</u> ₃₉₆	30	4,50	3,4	0,47	2,1	8700
6L	⁵⁰⁷ <u>DSRWAH</u> ₅₁₂	12	1,44	1,1	21,6	32,0	30
6H	⁵⁰⁷ <u>DSRWAH</u> ₅₁₂	27	3,24	2,5	2,3	6,5	650
7L	¹³² <u>LMPLF</u> ₁₃₆	9	1,35	1,0	24,3	34,7	35
9L	¹⁸³ <u>FIFN</u> ₁₈₆	12	1,44	1,1	21,6	32,0	30
9H	¹⁸³ <u>FIFN</u> ₁₈₆	27	3,24	2,5	2,3	6,5	650

Die Werte basieren auf den theoretischen Mutationsraten. Angegeben sind die Mittelwerte.

¹⁾ Die Codons unterstrichener AAn wurden nicht mutagenisiert. Die Nummerierung der AAn entspricht der Position in der 628 AAn langen Sequenz der WT-AS aus *N. polysaccharea* in der Kristallstruktur.

²⁾ Dies ist der theoretische Anteil an Nicht-WT-NT in jeder degenerierten Position im Primer-Gemisch. 9 % bedeutet z. B., dass an den betroffenen Positionen zu 91 % WT-NT und zu je 3 % die drei verbleibenden Nicht-WT-NT eingebaut werden sollten.

³⁾ Oligonucleotid für hohe Mutationsrate konzipiert, aber nach Sequenzierung von Mutanten als Segment mit niedriger Mutationsrate genutzt.

Die Bezeichnung „L“ (niedrig, engl.: *low*) steht für mutierte Oligonucleotide bzw. Segmente mit niedriger Mutationsrate. Sie sollten zur Kombination mit anderen Segmenten dienen. „H“ (hoch, engl.: *high*) bezeichnet die Segmente mit hoher Austauschrate, die nicht zur Kombination mit weiteren Regionen vorgesehen waren.

Zur Analyse der Qualität der Mutagenese wurde stichprobenartig aus jeweils ca. zehn zufällig gewählten Klonen die Plasmid-DNA isoliert und mit Hilfe der äußeren Oligonucleotide des mutierten Segments aus Tab. 12 sequenziert. Tab. 30 zeigt die experimentell ermittelten Zahlen von Mutationen der erstellten Banken.

Bei den ermittelten Austauschraten wurde tendenziell eine zu geringe Mutationsrate festgestellt, wobei es auch Abweichungen nach oben gab. Ein Grund hierfür kann sein, dass die Synthese der Oligonucleotide je nach eingebauter Base unterschiedlich schnell verlief. Das zunächst für die Herstellung von Bank 5H konzipierte Segment 5H-I wich mit lediglich 1,0 statt 2,4 AA-Austauschen pro Klon deutlich von der erwarteten

Mutationsrate ab. Es wurde daher ersatzweise für die Kombination mit Segment 6L zur Herstellung von Bank 5/6 benutzt. Weitere Segmente mit signifikant abweichender Mutationsrate waren 6H und 7L.

Tab. 30. Experimentell ermittelte Sequenzdaten der Variantenbanken

Name der Mutanten-/Varianten-bank	Mutagenes Oligo-nucleotid	Anzahl der zu mutagenisierenden Codons	Zahl der seq.-Klone	Substitutionen pro Klon		WT-Klone [%]	
				NT	AA	NT	AA
5H	5H-II	5	12	4,9	3,7	0,3	1,4
6H	6H	4	11	2,2	1,7	9,0	16,8
9H	9H	4	13	2,6	2,0	5,2	11,5
7/1	1L	5	10	1,2	0,9	5,9	12,1
	7L	5		1,5	1,1		
	Σ	10		2,7	2,0		
7/1/9	1L	5	10	1,4	1,1	2,3	6,0
	7L	5		0,4	0,3		
	9L	4		1,8	1,4		
	Σ	14		3,6	2,7		
5/6	5H-I ¹⁾	5	8	1,4	1,0	3,1	7,5
	6L	4		1,9	1,4		
	Σ	9		3,3	2,5		

¹⁾ Primer für hohe Mutationsrate konzipiert, aber nach Überprüfung durch Sequenzierung für die Kombination für niedrige Mutationsrate genutzt.

In den aus der Oligonucleotidsynthese stammenden Segmenten wurden mit Häufigkeiten von durchschnittlich 16 % Deletionen gefunden. Dieser Fehler führt meist zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu inaktiven AS-Derivaten.

Die Zahl der kultivierten Klone pro Variantenbank (Tab. 31) bildete einen Kompromiss zwischen Arbeitsaufwand einerseits und einer möglichst hohen Abdeckung der geschätzten Diversität andererseits. Aufgrund der exponentiellen Abhängigkeit sinkt mit steigender Diversität die Abdeckung ungeachtet der großen Anzahl kultivierter Klone rapide ab. Die Herstellung der Variantenbanken erfolgte gemäß der Angaben in Kapitel 2.4.2.5 und 2.4.5. Die Zahl von 376 Klonen pro MTP errechnet sich aus den 384 Mulden abzüglich der acht Mulden für Kontrollen mit WT-AS und Wirtszellen ohne AS-Gen.

Tab. 31. Abdeckung der Diversität der Variantenbanken

Varianten-Bank	Anzahl der kultivierten Klone	Anzahl der 384-Mulden-MTPn	Geschätzte Diversität ¹⁾	Abdeckung der geschätzten Diversität [%]
6H	376	1	147	92
9H	1130	3	384	95
7/1	5260	14	2230	91
5/6	9780	26	7660	72
5H	11280	30	21300	41
7/1/9	17300	46	52800	28

¹⁾ Aufgrund von Sequenz-Daten.

3.3.3. Screening der Banken

Die in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Banken von AS-Varianten wurden in Hochdurchsatz-Screenings (HTS) auf zwei verschiedene Eigenschaften hin untersucht.

Zum einen wurde der Umsatz von Allosac getestet. Die Erweiterung des engen Donor-Substratspektrums durch die Übertragung eines anderen Zuckerrestes als Glc ermöglicht die Erzeugung verschiedenster Oligosaccharide oder Glycokonjugate. Das Screening nach

diesen Varianten wurde nur mit dem Sac-Analogen Allosac durchgeführt, da nur dieses Substrat in ausreichender Menge und in ausreichender Reinheit in Bezug auf den Sac-Gehalt zur Verfügung stand.

Zum anderen wurden Varianten mit Defizienzen in der Polymerbildung gesucht. Die unlimitierte Elongationsreaktion des WT führt zu Akzeptoren mit unbekannten Kettenlängen. Für den industriellen Einsatz in enzymkatalysierten Systemen ist jedoch oftmals eine, bestenfalls auf einen einzigen Zuckerrest, limitierte Übertragung wünschenswert.

Die hohe Anzahl von Klonen erforderte eine weitgehende Automatisierung der Analysen. Zu diesem Zweck mussten die Kultivierung, die Lyse der Zellen und die Messung der Aktivitäten entsprechend angepasst werden. Eine Aufreinigung der Zelllysate in den MTPn für das HTS wurde nicht durchgeführt. Teile des Zellextrakts wurden direkt zu den Reaktionskomponenten pipettiert.

3.3.3.1. Kultivierung der Varianten in MTPn

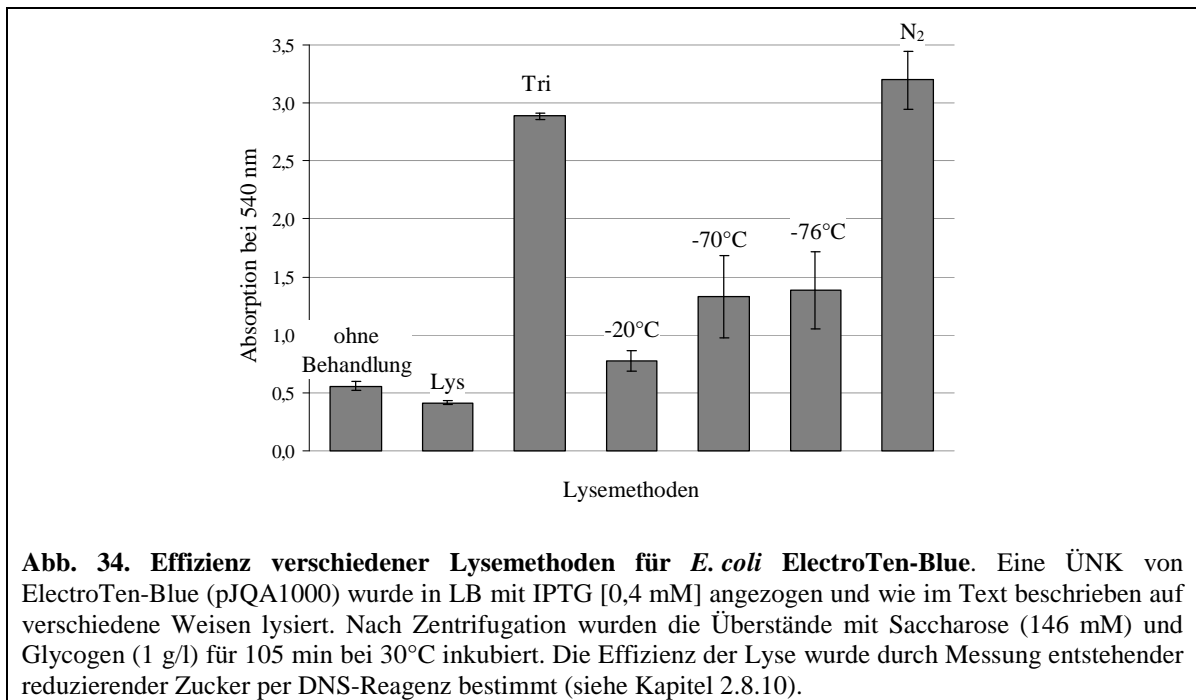
Von den Mutterplatten mit den Variantenbanken wurden für das HTS Replikate hergestellt (siehe Kapitel 2.4.6). Das dabei verwendete LB-Medium enthielt bereits IPTG zur Induktion. IPTG erst in der exponentiellen Phase des Zellwachstums zuzugeben war aufgrund der hohen Klon-Zahlen technisch schwer durchführbar.

Ein einfacher Test zur Optimierung des Zellwachstums im MTPn-Format wurde im Vorfeld mit drei unterschiedlichen Medien-Volumina durchgeführt (50, 100 und 200 μ l, Daten nicht gezeigt). Kleine Volumina führten zu höheren Zelldichten als große, was vermutlich auf ein günstigeres Verhältnis von Medium zu Oberfläche und damit auf eine bessere Sauerstoffversorgung der Zellen zurückzuführen ist. Allerdings bildeten sich bei nur 50 μ l Medium häufig Zellfäden am Boden der Mulden, die die Messung der OD₆₀₀ störten. Für die Replikation der MTPn wurden deshalb als Kompromiss 75 μ l Medium verwendet, wobei nur wenig Fadenbildung zu erkennen war.

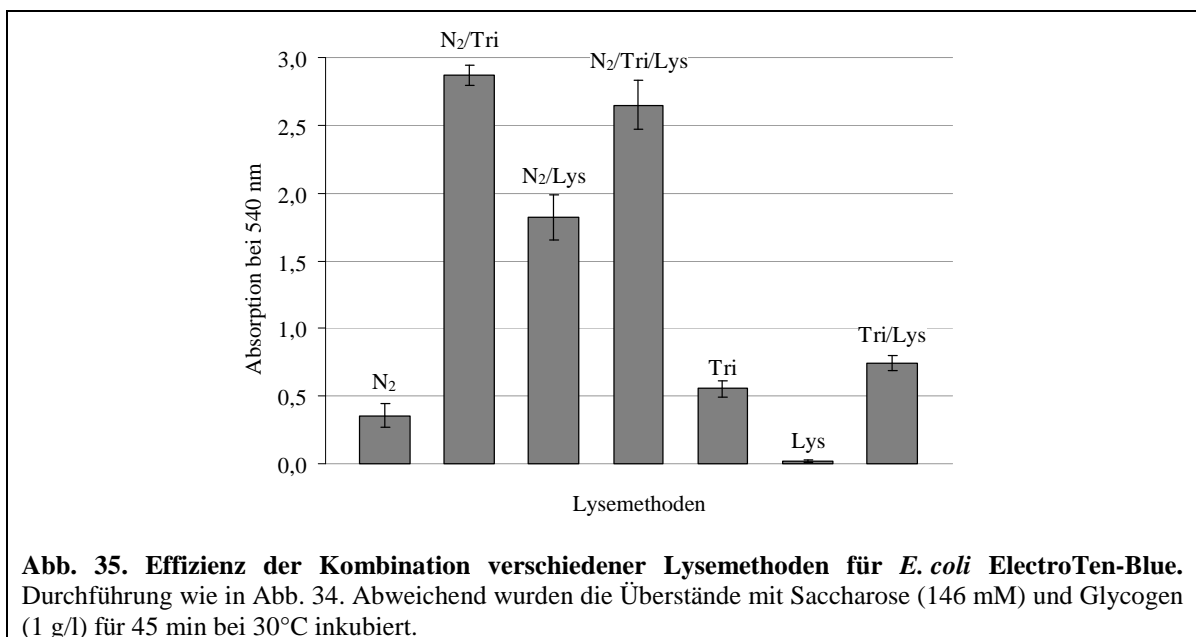
3.3.3.2. Optimierung der Zelllyse für das HTS

Für das HTS war es aus den oben erwähnten Gründen notwendig, die Lyse der Zellen direkt in den MTPn durchzuführen. Neben einer möglichst einfachen Durchführung sollte die Methode so effektiv wie möglich sein, um eine möglichst hohe Sensitivität des Aktivitätstests zu erreichen.

Von ElectroTen-Blue (pJQA1000) wurde eine ÜNK angelegt, der zur Induktion der Genexpression IPTG zugesetzt worden war. Aliquots dieser ÜNK (OD₆₀₀ \approx 1) wurden verschiedenen Zellaufschluss-Verfahren unterzogen (siehe Kapitel 2.4.4.3 bis 2.4.4.5), die anschließend teilweise miteinander kombiniert wurden. Vom Prinzip her wurden dabei drei Methoden verwendet: Die Gefrier-Auftau-, die enzymatische (Lysozym) und die chemische Lyse (Triton X-100). Als Indikator für die Güte der Lyse und die Aktivität der AS unter den jeweiligen Bedingungen diente ein einfacher Test auf enzymatische Aktivität durch Detektion entstehender reduzierender Zucker per 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) (siehe Kapitel 2.8.10). DNS wird dabei zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert, was einen Farbumschlag von gelb nach rot bewirkt. Die Konzentration der entstandenen 3-Amino-5-nitrosalicylsäure wird photometrisch bei 540 nm gemessen und entspricht der Konzentration an reduzierenden Endgruppen.



Als die mit Abstand besten Lyse-Verfahren erwiesen sich die Zugabe von Triton X-100 bzw. die Gefrier-Auftau-Lyse mit flüssigem Stickstoff (siehe Abb. 34). Die ebenfalls getesteten Gefrier-Auftau-Lysen bei -20° (Gefrierschrank), -70° (Tiefkühlschrank) und -76°C (EtOH/Trockeneisbad) waren weit weniger effizient und wurden nicht weiter verwendet. Die Inkubation mit Lysozym ergab keine messbare Steigerung gegenüber der Kontrolle ohne Behandlung. Zur weiteren Untersuchung wurde die beste der vier Gefrier-Auftau-Lysemethoden (flüssiger Stickstoff) mit den anderen beiden Verfahren kombiniert.



Es zeigte sich, dass eine Kombination des Detergenz Triton X-100 (1 %) mit der Gefrier-Auftau-Lyse durch flüssigen Stickstoff das beste Resultat ergab (siehe Abb. 35). Die bei gleichem Verfahren unterschiedlichen Absorptionen in Abb. 34 und Abb. 35 resultieren aus abweichenden Inkubations- sowie Reaktionsbedingungen von ÜNK und Zellextrakten.

Eine Variation der Triton X-100-Konzentration von 0,5 - 4 % erbrachte keine nennenswerten Unterschiede. Für das Screening wurde deshalb eine 1 %ige Triton-X-100-Konzentration gewählt, die eine nur moderate Blasenbildung durch das Detergenz bewirkt, dabei aber noch ca. 90 % der Lyseeffizienz besitzt wie die 4 %ige Konzentration (Daten nicht gezeigt).

3.3.3.3. Screening auf Umsatz von Allosaccharose

Um einen gesteigerten Umsatz von Allosac durch AS-Varianten im HTS sicher zu detektieren war es notwendig, ein Testsystem zu etablieren, das sensitiv genug ist, um die relativ geringere Aktivität der WT-AS mit diesem Donor nachzuweisen.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS-Variante:	22 µl Lysat (81 % (v/v) des gesamten Reaktionsansatzes)
Donor-Substrat:	Allosaccharose (Ch. 7036) [7 mM]
Zugesetzte Akzeptoren:	keine
Inkubationsdauer:	48 h
Analytik:	UV-photometrisch (340 nm)

Durch die lange Reaktionsdauer war eine kontinuierliche Messung der Aktivität, so wie in Kapitel 3.3.3.4 mit Sac als Substrat, nicht möglich. Tests hatten gezeigt, dass die für den photometrischen Nachweis benötigten Enzyme (siehe Kapitel 3.1.2.5) nach einer Inkubationszeit von 22 h inaktiv waren. Da eine wiederholte Zugabe der Enzyme über die Reaktionszeit von 48 h aus technischen Gründen nicht durchführbar war, wurden lediglich Endwerte bestimmt.

Dem Reaktionsgemisch wurde das Antibiotikum Chloramphenicol zugefügt. Einerseits sollte so ein unerwünschtes weiteres Wachstum von nicht lysierten *E.-coli*-Zellen verhindert werden, andererseits sollte damit das Wachstum von Bakterien unterdrückt werden, die unter den unsterilen Bedingungen des Pipettierautomaten als Kontamination in die Reaktionsgemische gelangen konnten. Aufgrund der langen Inkubationszeit von 48 h wurden die MTPn mit einer Folie abgeklebt, um einen Volumenverlust durch Verdunstung zu verhindern. In Einzelfällen wurde dennoch ein geringeres Endvolumen beobachtet, ausnahmslos in den äußeren Mulden der MTPn, vermutlich verursacht durch nicht korrekt verklebte Folien. Die MTPn wurden zur Inkubation zu Stapeln von je 4 Stück in Plastikbeutel verpackt, in die ein feuchtes Tuch gelegt wurde. Dieses sollte zusätzlich die Verdunstung aus den Mulden minimieren. Am Ende der Reaktionszeit zeigte sich zwischen Folie und Deckel fast aller MTPn bzw. in den Plastikbeuteln ein starker Feuchtigkeitsfilm. Warum sich die Feuchtigkeit auf diese Weise bildete, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Beim Entfernen der Folien wurde sorgfältig auf die Vermeidung einer Kontamination der Proben in den Mulden geachtet.

Für die UV-photometrische Messung (siehe Kapitel 2.8.2) wurde der Test in vereinfachter Form durchgeführt. Hierfür wurden der Hintergrund- und Glc-Wert (siehe Kapitel 2.8.5) in einer Messung vereinigt. Glc konnte in diesen Versuchen ohnehin nicht durch Umsatz des Edukts entstehen. In einem ersten Pipettierschritt erfolgte also die Zugabe des TRA-Puffers und auch der ersten Enzymsuspension für die enzymatische

Bildung von NADPH aufgrund des Glc-Hintergrunds. Nach Messung der A_{340} wurde zur Bestimmung der durch den Umsatz von Allosac gebildeten Fru-Menge anschließend die zweite Enzymsuspension zupipettiert.

Von den Varianten, die im Screening eine erhöhte Fru-Bildung relativ zum WT zeigten, wurden zur Überprüfung aus allen Banken insgesamt 24 Kandidaten konventionell untersucht. Von den 24 Varianten ließen sich jedoch nur 20 erfolgreich vermehren, von denen wiederum nur 10 nach entsprechender Induktion und Zelllyse eine AS-Bande im SDS-Gel aufwiesen. Einen Umsatz von Allosac zeigten lediglich drei dieser zehn Varianten, allerdings in keinem Fall besser als die WT-AS. Die Screening-Ergebnisse hielten also in keinem Fall der Überprüfung stand.

Tab. 32. MW und SA der normierten Messwerte für die Fru-Bildung der Positiv- und Negativ-Kontrollen der Variantenbanken

Varianten-Bank	Fru-Bildung							
	Wirtsstamm (Hintergrund)				Wildtyp-AS			
	MW (in Abs x 100/OD ₆₀₀)	SA [%]	SA der MW der MTPn ¹⁾ [%]	MW der SA innerhalb der MTPn ²⁾ [%]	MW (in Abs x 100/OD ₆₀₀)	SA [%]	SA der MW der MTPn ¹⁾ [%]	MW der SA innerhalb der MTPn ²⁾ [%]
6H	25	56	-	56	73	20	-	20
9H	21	75	51	50	82	41	34	29
7/1	171	53	33	30	275	39	29	19
5/6	203	78	67	26	292	54	45	18
5H	14	76	54	45	53	39	32	18
7/1/9	15	108	83	58	59	50	46	17

¹⁾ SA zwischen den Mittelwerten der einzelnen MTPn der Bank.

²⁾ Mittelwert der SA der einzelnen MTPn einer Bank.

Tab. 32 gibt einen Überblick über die Mittelwerte und Standardabweichungen der Positiv- und Negativkontrollen für jede Bank. Die Standardabweichung der Mittelwerte der einzelnen MTPn einer Bank stellt ein Maß für die Gleichmäßigkeit der Behandlung der verschiedenen Platten dar. Sie ist beim WT für alle Banken annähernd gleich, bedingt durch die weitgehende Automatisierung des Screenings. Die jeweils letzte Spalte stellt den Mittelwert der Standardabweichungen der einzelnen MTPn dar. Dieser Wert gibt an, wie reproduzierbar im Mittel diese Kontrollen innerhalb einer MTP waren. Bis auf Bank 9H (leicht höher) ergaben sich hier für den WT sehr ähnliche Werte von durchschnittlich etwa 20 % Standardabweichung für alle Banken. Etwa bei einem Zehntel der MTPn jeder einzelnen Bank (ein Drittel bei 9H) lag diese Standardabweichung gut doppelt so hoch wie im Durchschnitt. Es besteht aber allem Anschein nach kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Standardabweichung der einzelnen MTPn und der Selektion Falsch-positiver Varianten. In beiden Fällen wurden sowohl Positive als auch Falsch-Positive auf ein und derselben MTP gefunden.

Bei allen Banken war die Fru-Konzentration beim WT immer deutlich höher als beim Wirt. Bei Bank 7/1 und Bank 5/6 lagen allerdings sowohl die Werte der Positiv- als auch der Negativ-Kontrollen über denen der anderen Banken. Diese beiden Banken waren nach einer Änderung im Messverfahren des Screenings unter den zuletzt gültigen Versuchsbedingungen einmal wiederholt worden und hatten daraufhin diese Werte geliefert. Da ansonsten beim Verfahren keine Unterschiede zu den anderen Banken bestanden, ist das Zustandekommen dieser Ergebnisse unklar. Da die Werte der Varianten dieser beiden Banken aber im Durchschnitt noch unterhalb der Werte der Negativ-Kontrollen lagen, lag hier vermutlich ein Fehler im Screeningverfahren vor.

3.3.3.4. Screening auf Defizienz in der Kettenverlängerung

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in der Identifizierung von AA-Austauschen, die die Kettenverlängerung und damit die biotechnologisch oft unerwünschte Oligo- und Polysaccharidbildung beeinflussen. Da nur Varianten interessierten, deren katalytische Aktivität erhalten geblieben war, wurden die Banken zunächst auf katalytisch aktive Klone untersucht. Der Aktivitätstest wurde direkt im TRA-Gemisch des Analyse-Kits für die UV-photometrische Bestimmung der Glc- und Fru-Konzentration durchgeführt. Zuvor war in einem Vorversuch die Aktivität der AS in diesem Puffer überprüft worden. Die Messung im MTPn-Format wurde ferner vereinfacht, indem die beiden Enzymsuspensionen für die Messung der Freisetzung von Glc und Fru (siehe Kapitel 2.8.2) zugleich in den Reaktionsansatz pipettiert wurden. Die benötigte Stabilität der Enzyme des Analyse-Kits über die Dauer der Reaktion konnte ebenfalls bestätigt werden. Es erfolgte also keine getrennte Messung der Konzentration dieser beiden Monosaccharide. Durch die Zugabe von Glycogen in die Reaktion wird jedoch bei WT-AS der Hydrolyse-Anteil und damit die Glc-Konzentration erheblich verringert, so dass effektiv fast nur die Konzentration der freigesetzten Fru gemessen und für die Berechnung der Aktivität genutzt wird. Die Konzentration von Sac, der Anteil Lysat und die Inkubationsdauer wurden absichtlich so gewählt, dass die Absorption bei der UV-photometrischen Messung möglichst Werte von 2,0 nicht übersteigt.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS (-Variante):	5 µl Lysat (12 % (v/v) des gesamten Reaktionsansatzes)
Donor-Substrat:	Saccharose [50 mM]
Zugesetzter Akzeptor:	Glycogen [0,1 g/l]
Inkubationsdauer:	45 min
Temperatur:	RT
Analytik:	UV-photometrisch (340 nm)

In Tab. 33 sind die unter den beschriebenen Bedingungen ermittelten Anteile der aktiven Klone an jeder Bank angegeben. Deutliche Unterschiede waren beim Einfluss der einzelnen Regionen auf die katalytische Aktivität von AS erkennbar. Der höchste Anteil von aktiven Klonen war dabei in der Bank 9H mit rund zwei Drittel der Varianten zu verzeichnen.

Tab. 33. Anteil aktiver Varianten in den erzeugten Banken

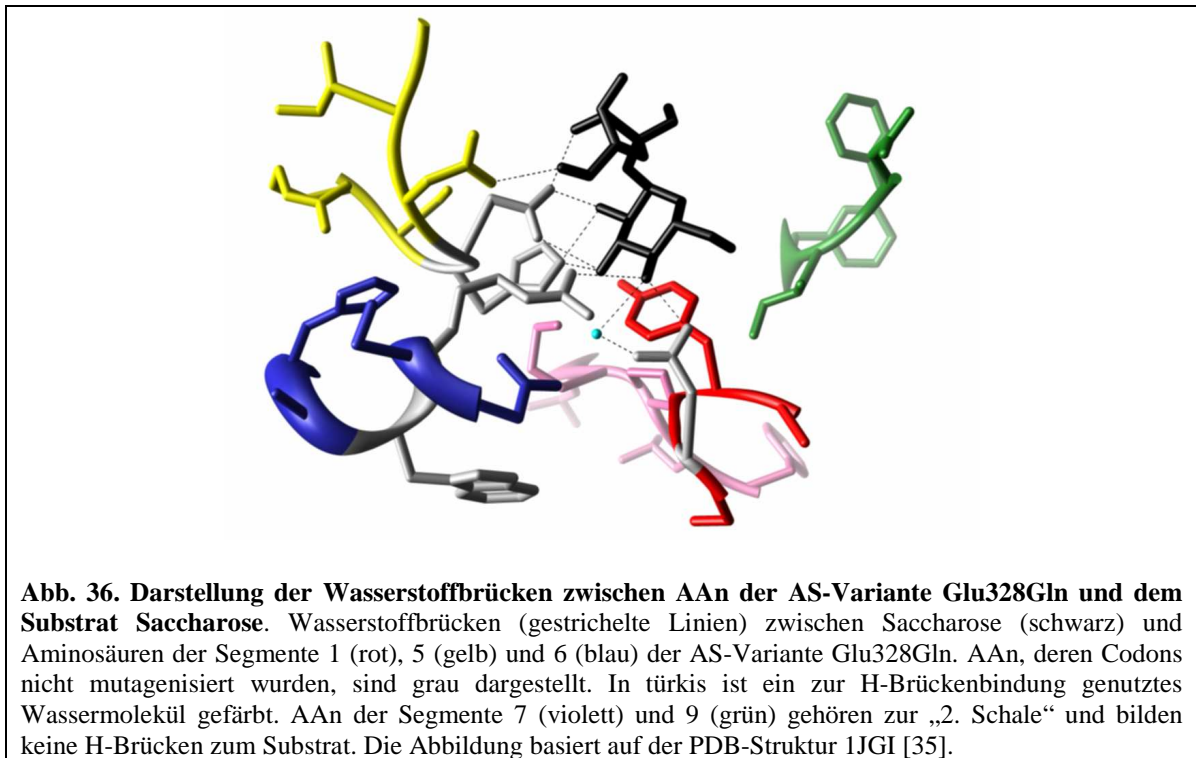
Varianten-Bank	Anteil aktiver Varianten [%] ¹⁾	Anzahl der durchschnittlichen AA-Substitutionen pro Klon
6H	37,2	1,7
9H	66,3	2,0
7/1	38,5	2,0
5/6	11,9	2,5
5H	6,7	3,7
7/1/9	30,8	2,7

¹⁾ Mit Sac als Donor und Glycogen als Akzeptor. Abzüglich des experimentell ermittelten Anteils von WT-Klonen (Tab. 30). Der wahre Anteil der aktiven Varianten kann höher liegen, da Zelldichten nicht berücksichtigt wurden.

Bei gleicher AA-Austauschrate lag deren Anteil in Bank 7/1 nur bei ca. 39 %, ähnlich wie bei Bank 6H, deren AA-Austauschrate der der Bank 7/1 ähnelte. In Bank 7/1/9 waren bei 1,6-fach mehr AA-Substitutionen als in Bank 6H noch knapp ein Drittel der Klone aktiv.

Deutlich geringere Anteile aktiver Klone fanden sich bei Bank 5H und Bank 5/6. Aufgrund der höchsten Mutationsrate nicht unerwartet, waren in Bank 5H mit ca. 7 % die wenigsten Klone noch aktiv. Allerdings wies Bank 5/6 bei nur zwei Drittel der Austauschrate von Bank 5H und etwa derselben Substitutionsfrequenz wie Bank 7/1/9 eine knapp doppelt so hohe Rate aktiver Klone wie Bank 5H auf.

Im Vergleich der hier untersuchten Segmente scheint also 5 und möglicherweise 6 den größten Einfluss auf die Aktivität zu besitzen, während die AAn des Segments 9 den geringsten Einfluss ausüben. Teilweise lässt sich dieses Ergebnis durch die direkte Wechselwirkung der AAn mit dem Substrat Sac bzw. dem Glc-Rest im AS-Glc-Intermediat erklären. Abb. 36 und Tab. 34 zeigen, welche AAn aus den fünf Segmenten mit OH-Gruppen der Sac Wasserstoffbrücken bilden. Eine hydrophobe Wechselwirkung besteht zudem zwischen Tyr147 in Region 1 mit seinem aromatischen Ring und der Glc (hydrophobe Plattform, siehe Kapitel 3.2).



Am häufigsten ist in diese Wechselwirkungen die Region 5 involviert, Region 1 und 6 sind mit jeweils einer AA vertreten. Allerdings wurde von den betreffenden Resten der Region 5 nur Asp394 potentiell ausgetauscht. Doch ist auch durch Substitution benachbarter AAn eine Repositionierung dieser Reste und damit eine Störung der Wechselwirkungen wahrscheinlich und dürfte in den meisten Fällen zu einer Verringerung der Aktivität führen.

Tab. 34. Direkte Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren in den mutierten Segmenten der Amylosucrase und dem Substrat Saccharose

Position ¹⁾	Region	H-Brücken ²⁾	Hydrophobe WW
Asp144	1	O4-Glc / O4-Glc über H ₂ O-Molekül	
Tyr147	1		Glc-Ring
His392	5	O2-Glc / O3-Glc	
Asp393	5	O2-Glc / O3-Glc	
		O3-Fru	
Asp394	5	O6-Fru	
Arg509	6	O4-Glc	

¹⁾ Numerierung bezieht sich auf die 628 AAn lange AA-Sequenz der Kristall-Struktur von AS.

²⁾ Kristall-Struktur der inaktiven Mutante Glu328Gln mit Sac (1JGI, [35]).

Die Fähigkeit zur Bildung eines Polymers wurde im Screening durch die Zugabe einer Iodlösung getestet (siehe 2.8.7). Die Reaktion ist als Stärkenachweis bekannt. Eine Braun- bis Blaufärbung zeigt die Bildung eines amyloseartigen Oligo- oder Polysaccharids. Eine schwache oder nicht vorhandene Färbung trotz nachgewiesenen Sac-Verbrauchs (Nachweis siehe oben) deutet auf eine Defizienz in der Polymerbildung hin. Auch Polymer-negativ gewertet würden Varianten, bei denen durch Änderungen in der Verknüpfung der gebildeten Polymere eine Anfärbung mittels Iodlösung nicht mehr möglich war.

Der Polymer-Test erfolgte nach Abschluss der vier Absorptions-Messungen (siehe 2.8.6) durch Zugabe von Iodlösung.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

Indikator:	3 mM I ₂ , 50 mM KI
Inkubationsdauer:	10 min bei RT
Analytik:	UV-photometrisch (570 nm)

Die Positiv-Kontrollen mit WT-AS ergaben deutlich sichtbare dunkle Blaufärbungen des Reaktionsansatzes. Die Negativ-Kontrollen erschienen leicht gelb gefärbt. Alle Reaktionsgemische wiesen direkt nach Zugabe der Iodlösung eine Trübung auf, die innerhalb weniger Minuten verschwand. Um einen Einfluss dieser Trübung auf die Messergebnisse auszuschließen, erfolgte die Absorptions-Messung erst nach vollständiger Klärung nach 10-minütiger Inkubation bei RT.

Die Tab. 35 gibt die Anteile aktiver und Polymer-defizienter Varianten in den Banken an. In der Bank 5H waren ca. 84 % der aktiven Varianten nicht mehr in der Lage, ein Polymer zu bilden. Dies stellte mit Abstand den höchsten Anteil aller Banken dar. Die Banken 5/6, 7/1/9, 7/1 und 9H wiesen mit 52-42 % vergleichsweise ähnliche Werte Polymer-defizienter Varianten auf. Die Bank 6H beinhaltete mit 28 % dagegen den geringsten Anteil. Da die Substitutionen pro Klon für die Segmente 6H (in Bank 6H) und 6L (in Bank 5/6) (Tab. 30) mit 1,7 bzw. 1,4 ähnlich hoch waren, resultierte die Defizienz in der Polymerbildung in Bank 5/6 offenbar größtenteils aus der Mutation des Segments 5.

Tab. 35. Verteilung aktiver und Polymer-defizienter Klone in den erzeugten Variantenbanken

Varianten-Bank	Anteil der aktiven Varianten in der Bank [%] ¹⁾	Anteil der Polymer-negativen Varianten an den aktiven Varianten [%]
6H	37,2	28,0
9H	66,3	41,5
7/1	38,5	42,3
5/6	11,9	52,0
5H	6,7	83,5
7/1/9	30,8	45,7

¹⁾ Abzüglich des experimentell ermittelten Anteils von WT-Klonen (Tab. 30). Nicht angewachsene Klone wurden hier als inaktiv gewertet.

Die Überprüfung ausgewählter Varianten der Banken 5H und 7/1 zeigte jedoch, dass letztere zwar unter den im HTS angewandten Bedingungen Polymer-negativ erschienen, unter empfindlicheren Bedingungen aber eine deutlich messbare Fähigkeit zur Polymerproduktion aufwiesen (siehe Kapitel 3.3.4).

3.3.4. Überprüfung der Screening-Ergebnisse ausgewählter Varianten

Zur Überprüfung der Resultate des Screenings wurden Varianten ausgewählt, die erstens keine detektierbare Polymerproduktion und zweitens einen möglichst hohen Sac-Umsatz aufwiesen. Die Auswahl wurde aus Zeitgründen auf die Banken 7/1 und 5H beschränkt, von denen jeweils 15 Varianten näher untersucht wurden. Bank 5H wurde gewählt, da hier die deutlichsten Veränderungen in den oben genannten Eigenschaften zu verzeichnen waren. Aufgrund des verhältnismäßig geringen Einflusses von Segment 6 wurde auf die Untersuchung einzelner Klone aus Bank 5/6 sowie aus Bank 6H verzichtet. Bank 7/1 erschien am sinnvollsten als Vertreter für Substitutionen in den übrigen Segmenten, da der Anteil Polymer-negativer Varianten in der Kombination der Segmente 7/1/9 nicht höher als bei 7/1 alleine lag (siehe Tab. 35) und die größere Zahl möglicher AA-Austausche in einem dritten Segment eine Interpretation der Ergebnisse erschwert.

3.3.4.1. Kultivierung, Lyse und AS-Konzentrierung ausgewählter Varianten

Die Varianten erhielten die Nummern 01-15 (Bank 7/1) und 16-30 (Bank 5H). Die Kultivierung und Lyse wurde durchgeführt wie unter 2.4.7 beschrieben. Zur Herstellung der Zellextrakte wurden sie auf eine OD₆₀₀ von 10-15 konzentriert, so dass die Gesamt-Protein-Konzentration 1,2-1,7 mg/ml betrug. Die Proteinextrakte wurden per SDS-PAGE analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Menge an AS war in 26 der 30 Proben gleichmäßig hoch, die Bande in Probe 26 war etwas schwächer und die Proben 12, 14 und 22 wiesen nur eine sehr schwache AS-Bande auf.

3.3.4.2. Aktivitätsmessungen Polymer-negativer Varianten

Mit den Zellextrakten aus 3.3.4.1 wurden Messungen des Umsatzes von Sac sowohl mit als auch ohne Glycogen-Zusatz durchgeführt, da eine Beeinträchtigung der Elongation von Glycogen sich wahrscheinlich auch in einer geringen Aktivierung durch dieses Glucan zeigen sollte.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS (-Variante):	100 µl Lysat (13 % (v/v) des gesamten Reaktionsansatzes)
Donor-Substrat:	Saccharose [146 mM]
Zugesetzte Akzeptor(en):	keine bzw. Glycogen [0,1 g/l]
Inkubationsdauer:	15 min
Temperatur:	30°C
Analytik:	UV-photometrisch (340 nm)

Die UV-photometrische Analyse erfolgte in vereinfachter Form mit einem Teil des Reaktionsansatzes im MTPn-Format (siehe Kapitel 2.8.2). Die Ergebnisse sind, nach Banken getrennt, im Folgenden beschrieben.

3.3.4.2.1. Aktivität Polymer-negativer Varianten aus Bank 5H

Tab. 36 zeigt die spezifischen Aktivitäten, bezogen auf die per SDS-PAGE ermittelten AS-Konzentrationen, und den Hydrolyse-Anteil ausgewählter Varianten der Bank 5H mit und ohne Glycogen. Mit Ausnahme von V22 wurde bei allen Varianten Aktivität bestätigt. Die meisten Varianten zeigten deutliche quantitative Unterschiede relativ zum WT. Mit Sac als einzigem Substrat lag der Hydrolyse-Anteil bei fast allen Varianten und beim WT annähernd bei 100 %. Als einzige Ausnahme war bei V17 mit ca. 80 % ein geringerer Hydrolyse-Anteil zu verzeichnen. Bei diesen Reaktionsbedingungen wiesen bis auf V25 alle Varianten eine erhöhte Aktivität gegenüber dem WT auf, die aktivsten Varianten um den Faktor 6 bis 7.

Tab. 36. Vergleich der Aktivität Polymer-negativer Varianten der Bank 5H ohne bzw. mit Glycogen¹⁾

AS	Ohne Glycogen				Mit Glycogen			
	Spezifische Aktivität [U/g]			Hyd-Anteil [%]	Spezifische Aktivität [U/g]			Hyd-Anteil [%]
	Tot	Tra	Hyd		Tot	Tra	Hyd	
WT	1280	0	1280	100	14070	12700	1370	10
V16	9330	420	8910	96	9540	90	9450	99
V17	8220	1820	6400	78	11000	4950	6050	55
V18	2970	130	2840	96	3030	180	2850	94
V19	3550	0	3550	100	3360	0	3360	100
V20	4570	400	4170	91	4370	420	3950	90
V21	1730	0	1730	100	2080	0	2080	100
V22	0	0	0	-	0	0	0	-
V23	4710	0	4710	100	5460	100	5360	98
V24	2320	140	2180	94	1960	0	1960	100
V25	990	0	990	100	1040	0	1040	100
V26	3550	350	3200	90	5850	2690	3160	54
V27	5870	0	5870	100	8280	1400	6880	83
V28	1530	10	1520	100	3570	2020	1550	43
V29	2640	140	2500	95	2410	120	2290	95
V30	4000	0	4000	100	4250	0	4250	100

¹⁾ Tot: Gesamtaktivität, Tra: Transglucosylierung, Hyd: Hydrolyse.

Kursiv dargestellte Werte sind unsicher aufgrund niedriger Protein-Konzentration.

-: Angabe nicht möglich.

In Anwesenheit von Glycogen stieg die Gesamtaktivität des WT bei unveränderter Hydrolyse-Aktivität um das 10-fache an. Die Varianten zeigten keine oder nur eine geringe (bis 2,3-fache) Steigerung der Aktivität durch Glycogen. Übereinstimmend mit dem WT (vergleiche auch 3.1.3.1.2) bezog sich auch bei den Varianten diese Zunahme

ausschließlich auf die Transglucosylierung, die Hydrolyse-Raten blieben unverändert. Am deutlichsten wurde die Tra-Aktivität bei V17, V27 und V28 durch Glycogen gesteigert.

3.3.4.2.2. Aktivität ausgewählter Varianten aus Bank 7/1

Tab. 37 zeigt die spezifischen Aktivitäten und den Hydrolyse-Anteil ausgewählter Varianten der Bank 7/1 mit und ohne Glycogen. In Abwesenheit von Glycogen lag der Hydrolyse-Anteil auch hier bei allen Varianten bei ca. 100 %. Drei Varianten (V02, V06 und V07) zeigten eine erhöhte Aktivität gegenüber dem WT (1,2- bis 1,7-fach). Die übrigen Varianten waren entweder gleich oder weniger aktiv, wobei V05 mit ca. 10 % Restaktivität den deutlich geringsten Wert besaß.

Anders als bei Bank 5H zeigten sich mit Glycogen als zusätzlichem Substrat deutliche Unterschiede. Es steigerte die Transglucosylierungs-Rate bei allen Varianten, am stärksten bei den Varianten V05 und V08 (30 bis 60-fach), am wenigsten bei V06, V07 und V13 (ca. 3-fach). Die Hydrolyse-Rate blieb wie in Bank 5H unverändert, einzig V05 zeigte hier möglicherweise eine Erhöhung auf etwa das Doppelte. Demzufolge verringerte sich der Anteil der Hydrolyse bei allen Varianten, am stärksten bei Variante V05 (3 %), am wenigsten bei V06, V07 und V13 (33-37 %).

Tab. 37. Vergleich der Aktivität Polymer-negativer Varianten der Bank 7/1 ohne bzw. mit Glycogen¹⁾

AS	Ohne Glycogen				Mit Glycogen			
	Spezifische Aktivität [U/g]			Hyd-Anteil [%]	Spezifische Aktivität [U/g]			Hyd-Anteil [%]
	Tot	Tra	Hyd		Tot	Tra	Hyd	
WT	1280	0	1280	100	14070	12700	1370	10
V01	340	10	330	98	5560	5250	310	6
V02	1510	0	1510	100	15200	13500	1690	11
V03	390	0	390	100	6940	6560	380	6
V04	690	0	690	100	5510	4810	700	13
V05	90	0	90	100	6430	6230	200	3
V06	2160	160	2000	93	6540	4410	2130	33
V07	1740	0	1740	100	5160	3440	1720	33
V08	185	5	180	97	5490	5180	310	6
V09	950	0	950	100	4680	3710	970	21
V10	240	0	240	100	2660	2390	270	10
V11	530	0	530	100	8240	7710	530	6
V12	990	0	990	100	13200	12600	580	4
V13	1140	30	1110	97	2390	1510	880	37
V14	1320	0	1320	100	23400	22000	1400	6
V15	690	0	690	100	8570	7890	680	8

¹⁾ Tot: Gesamtaktivität, Tra: Transglucosylierung, Hyd: Hydrolyse.

Kursiv dargestellte Werte sind unsicher aufgrund niedriger Protein-Konzentration bzw. niedriger Absorption.

3.3.4.2.3. Test auf *de-novo*-Polymerbildung

Es wurde untersucht, ob die ausgewählten Varianten in der Lage sind, ohne Glycogen, also *de novo*, Iod-färbbare Oligo- oder Polysaccharide zu bilden. Dazu wurden Zellextrakte der 30 Varianten mit Sac für 24 h inkubiert (siehe Versuchsbedingungen 3.3.4.3). Zu den Reaktionsansätzen wurde nach Abschluss der Inkubation Iodlösung pipettiert (siehe 2.8.7). Aufgrund einer anhaltenden Trübung wurden die Färbungen nur qualitativ bewertet (Daten nicht gezeigt).

Für die Bank 5H stimmten die Resultate mit dem Ergebnis aus dem Screening überein. Bei keiner Variante war eine Färbung sichtbar. Im Gegensatz dazu war bei allen Varianten

der Bank 7/1 eine Färbung zu sehen, am stärksten bei V01-V05, V08 und V11, am schwächsten bei V06, V07, V09 und V13. Offenbar aufgrund einer unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden Tests hatten die Screenings der Bank 7/1 zu falsch-negativen Ergebnissen geführt.

3.3.4.3. Produktmuster mit verschiedenen Substraten

Zum Vergleich der Produktmuster von WT und Polymer-negativen Varianten wurden ÜN-Inkubationen mit Sac als alleinigem Substrat, sowie mit zusätzlich α -MeG1 als potentiell Akzeptor durchgeführt. Per DC wurden anschließend die Produktmuster aller Proben miteinander verglichen.

Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

AS (-Variante):	100 μ l Lysat (20 % (v/v) des gesamten Reaktionsansatzes)
Donor-Substrat:	Saccharose [146 mM]
Zugesetzte Akzeptor(en):	keine bzw. α -MeG1 [146 mM]
Inkubationsdauer:	24 h
Analytik:	DC

3.3.4.3.1. Ausgewählte Varianten der Bank 5H

Die Produktmuster aller Varianten unterschieden sich in der *de-novo*-Reaktion deutlich von dem des WT (siehe Abb. 37). Abgesehen von verbliebener Sac zeigten sich beim WT mit abnehmender Mobilität die Produkte Fru, Glc, Tur (leicht überlappend mit Sac), Glc2, wahrscheinlich Tre, Glc3 und länger-kettige Oligosaccharide, die in der Konzentrierungszone der DC-Platte verblieben. Geringfügige Tre-Bildung durch AS wurde bereits beschrieben [41]; Tre stand jedoch nicht zu Vergleichszwecken zur Verfügung. Allerdings wurde gezeigt (siehe Abb. 45), dass die Bildung der betreffenden Bande Fru-abhängig ist. Glc3 war das am stärksten vertretene Glc-Oligomer. Die Varianten bildeten zwar auch Sac-Isomere, waren aber bemerkenswerterweise ausnahmslos nicht mehr in der Lage, auch nur Tetramere zu synthetisieren.

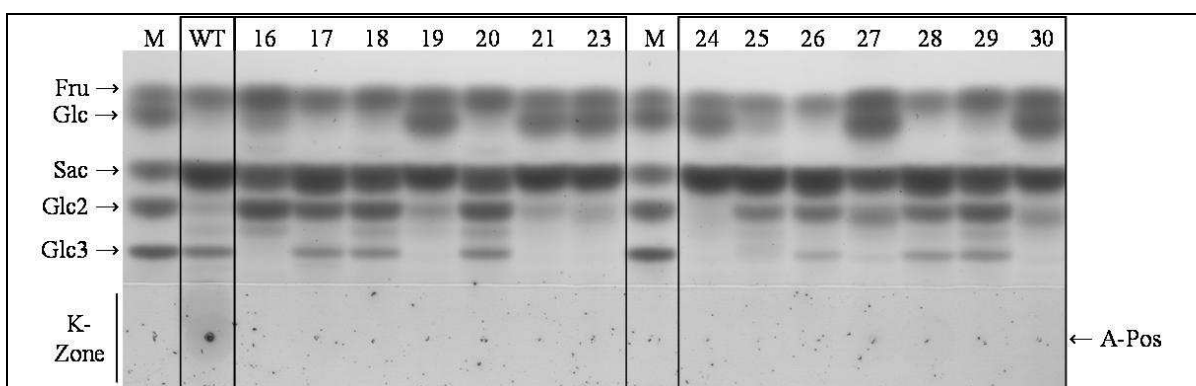
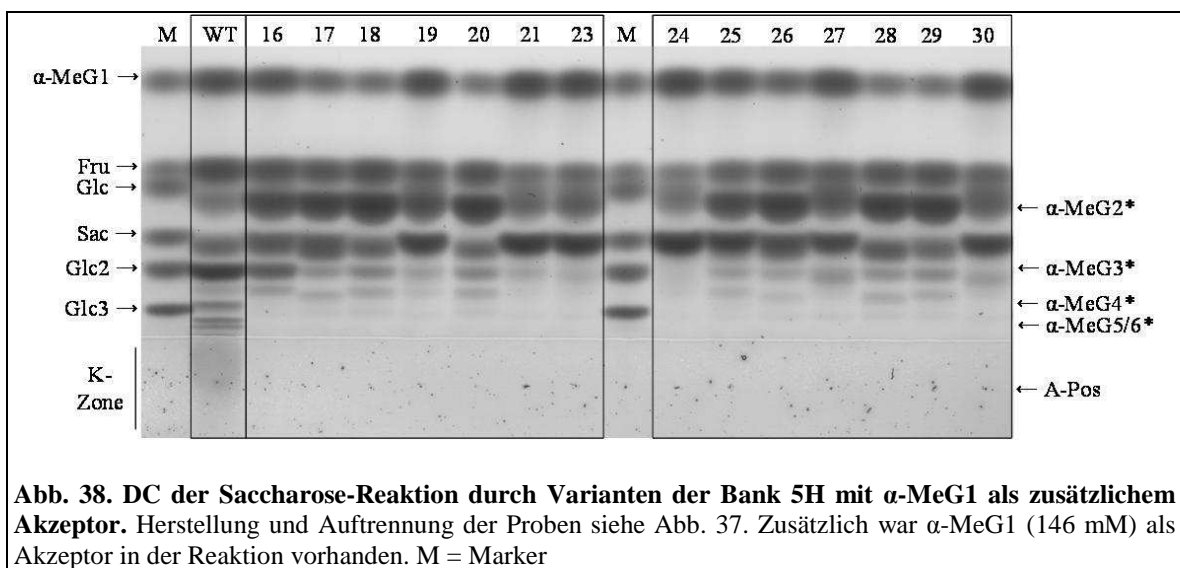


Abb. 37. DC der Saccharose-Reaktion durch Varianten der Bank 5H ohne zusätzlichen Akzeptor (*de novo*). Zellextrakte (3.3.4.1) wurden für 24 h bei 30°C mit Saccharose (146 mM) als einzigem Substrat unter Standardbedingungen inkubiert. Aufgetrennt wurden je 1,5 μ l der Reaktion nach Hitzeinaktivierung und 1:6 Verdünnung mit H₂O. Als Laufmittel diente Ethylacetat/ Isopropanol/ H₂O (6:3:1, v/v/v). M = Marker

Die Enzyme ließen sich grob in drei Gruppen unterteilen. Die eine Gruppe zeigte keine (V24) oder wenig (V19, V21, V23, V27, V30) Glc2-Bildung, bildete aber viel Glc. Die zweite hatte Glc2 als Hauptprodukt, welches kaum vom WT gebildet wird, zusammen mit geringem Anteil von Glc3 (V17, V18, V20, V25, V26, V28, V29). Der dritte Typ, nur durch V16 vertreten, synthetisiert Glc2 als Hauptprodukt, aber so gut wie keine längeren Oligomere.

Abb. 38 zeigt die Produkte der Sac-Reaktion in Anwesenheit des beim WT effizienten Akzeptors α -MeG1 (siehe Ergebnisse in Kapitel 3.1.3.3). Beim WT war ein vollständiger Umsatz der Sac zu sehen. Neben Fru-Isomeren waren Oligomere bis α -MeG6, mit α -MeG3 als Hauptprodukt, sowie länger-kettige Oligomere zu sehen. Alle Varianten nutzten mit unterschiedlicher Effizienz α -MeG1 als Primer-Molekül. Eine geringe Effizienz konnte bei den Varianten V19, V21, V23, V24, V27 und V30 beobachtet werden, übereinstimmend mit der geringen Oligomerbildung mit Sac als einzigem Substrat. Im Gegensatz zum WT war α -MeG2 mit allen Varianten das Hauptprodukt. In keinem Fall wurde die Bildung von in der Auftragszone verbleibenden Produkten oder Oligomeren, die länger als α -MeG3 waren, beobachtet. Wie mit Sac alleine, bildete V16 scheinbar nur das Dimer. Die relativ starke Bande auf Höhe von α -MeG3 ist Glc2, welches effizient von V16 gebildet wird und mit α -MeG3 komigriert. Diese Differenzierung konnte aufgrund des zeitlichen Verlaufs gemacht werden, der eine sehr viel langsamere Bildung von Glc2 als von den α -MeG-Akzeptor-Produkten zeigte.



Basierend auf diesen Ergebnissen wurden fünf Varianten (V16, V17, V19, V20 und V28) für die Aufreinigung und weitere Charakterisierung ausgewählt.

3.3.4.3.2. Ausgewählte Varianten der Bank 7/1

Die im HTS ermittelte Defizienz in der Glycogen-abhängigen Polymerbildung konnte bei den ausgewählten Varianten aus Bank 7/1 bei der Akzeptor-unabhängigen Polymerbildung nicht bestätigt werden (siehe 3.3.4.2.3). Dies wurde auch durch die Produktmuster gezeigt. Die Reaktionen mit Sac als alleinigem Substrat zeigten bei den meisten Varianten länger-kettige Oligosaccharide, die in der Konzentrierungszone verblieben sowie Glc3 als Hauptprodukt. Diese Charakteristika wurden auch beim WT gefunden (Abb. 39).

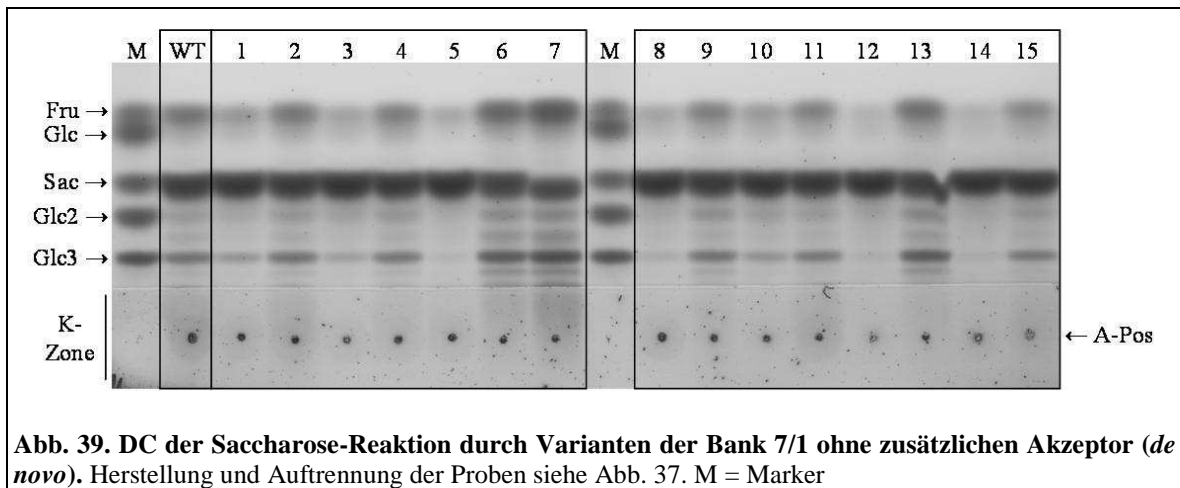


Abb. 39. DC der Saccharose-Reaktion durch Varianten der Bank 7/1 ohne zusätzlichen Akzeptor (*de novo*). Herstellung und Auftrennung der Proben siehe Abb. 37. M = Marker

Anhand der Produktmuster der Abb. 39 und Abb. 40 und in Korrelation mit den Aktivitäten aus Tab. 37 ließen sich die fünfzehn Varianten in vier Gruppen einteilen.

In Gruppe A fielen die Varianten V05, V08, V12 und V14, wobei für die letzten beiden jedoch eine verlässliche Eingruppierung aufgrund der geringen AS-Menge im Zellextrakt (3.3.4.1) problematisch war. Gruppe A-Varianten wiesen mit weniger als 200 U/g (ausgenommen V12 und V14) die geringste Aktivität mit Sac als einzigem Substrat auf. Dies Ergebnis korreliert recht gut mit der DC-Analyse des Produktmusters (Abb. 39), welches kaum Produkte einschließlich Glc3-Bildung zeigte. Andererseits ließen sich diese Varianten am stärksten (ca. 30-fach) durch Glycogenzugabe aktivieren. Zudem war der Hydrolyse-Anteil in Anwesenheit dieses Akzeptors am geringsten (3-6 %).

Die Varianten in Gruppe B (V01, V03 und V10) besaßen eine etwa doppelt so hohe Aktivität wie die der Gruppe A, die Glycogenaktivierung war im Mittel nur halb so hoch und der Hydrolyse-Anteil mit 6-10 % etwas größer. Mit Sac als einzigem Substrat war wenig Produkt auf dem DC sichtbar. Glc3 war stets das Hauptprodukt, dies war auch bei den Gruppen C und D der Fall.

Gruppe C bildeten die Varianten V02, V04, V09, V11 und V15 sowie der WT. Die Aktivität lag mit 500-1000 U/g (Ausnahmen WT: 1280, V02:1510) deutlich höher als bei A und B. Zugleich nahm die Aktivierbarkeit durch Glycogen weiter ab (durchschnittlich 10-fach) und der Hydrolyse-Anteil weiter zu (10-20 %; Ausnahmen V11 und V15: durchschnittlich 7 %). Diese Varianten bildeten relativ viel Produkt mit Sac.

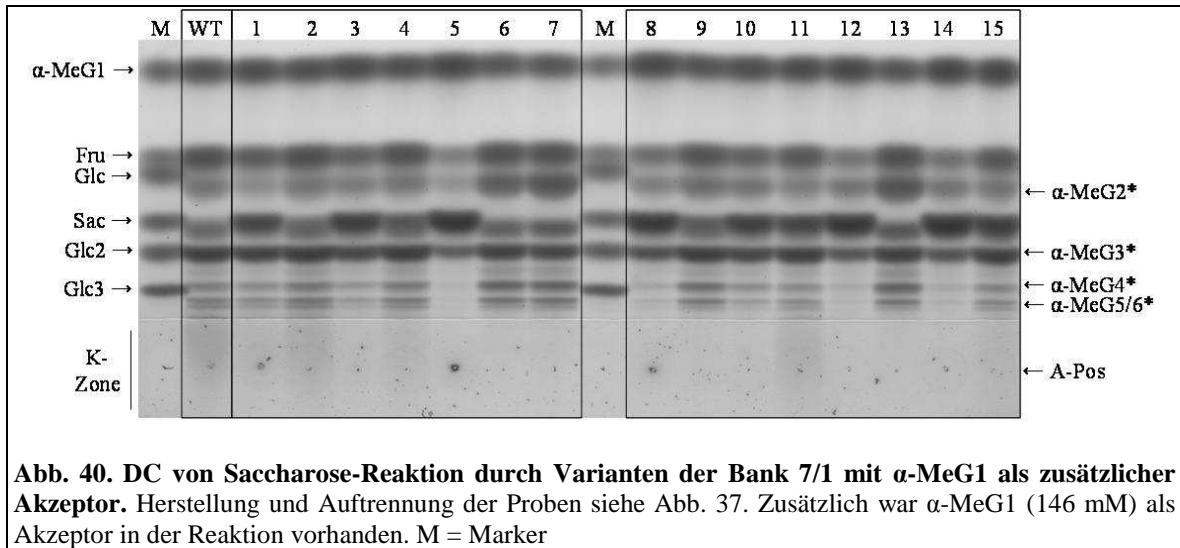
In die Gruppe D entfielen die Varianten V06, V07 und V13. Sie besaßen die höchste Aktivität in Abwesenheit von Glycogen (bis 2000 U/g), sowie die geringste Steigerung bei Zugabe dieses Akzeptors (ca. 3-fach). Der Hydrolyse-Anteil war mit ca. 35 % deutlich am höchsten. Diese Varianten bildeten viel Produkt mit Sac als einzigem Substrat. Der Anteil von Produkten, die in der K-Zone verblieben, war, relativ zum WT, scheinbar verringert zugunsten von Oligosacchariden mit kurzen Kettenlängen. Dies korreliert mit der schwachen Iodfärbung derselben Reaktionsansätze (siehe 3.3.4.2.3).

Abb. 40 zeigt die Produkte der Sac-Reaktion in Anwesenheit von α -MeG1. Alle Varianten nutzten mit unterschiedlicher Effizienz α -MeG1 als Primer-Molekül. Beim WT und bei vier Varianten war ein (fast) kompletter Umsatz der Sac zu sehen (V02, V06, V07 und V13). Neben Fru-Isomeren waren Oligomere bis α -MeG6, mit α -MeG3 als Hauptprodukt, sowie bei einigen Varianten (V01, V02, V04, V05, V08, V11 und V15) in der Konzentrierungszone verbleibende Produkte zu sehen. Die geringste Aktivität der ausgewählten Varianten dieser Bank zeigte V05.

Bei den Varianten der Gruppen A, B und C war α -MeG3 das Hauptprodukt. Die Varianten der Gruppe A scheinen von einem Kettenstarter-Molekül abhängig zu sein. Die

Verlängerung von α -MeG2 zu α -MeG3 ist dagegen offenbar nicht verlangsamt. Produkte mit mehr als drei Glc-Resten fehlen fast vollständig.

Im Gegensatz dazu scheint bei den Varianten der Gruppe D (V06, V07 und V13) die Glucosylierung von α -MeG2 verlangsamt und/oder von α -MeG1 beschleunigt zu verlaufen. Diese Varianten stellten deutlich mehr α -MeG2 her als die übrigen und annähernd so viel wie α -MeG3. Damit verhalten sie sich eindeutig anders als ohne α -MeG1, wo stets deutlich mehr Tri- als Dimer gebildet wurde.



Basierend auf diesen Ergebnissen wurden zwei Varianten aus Bank 7/1 (V05 und V07), die zu den am deutlichsten in den Produktmustern vom WT abweichenden Typen gehören, für die Aufreinigung und weitere Charakterisierung ausgewählt.

3.3.4.4. Identifizierung der Aminosäure-Austausche

Zur Bestimmung der AA-Abfolge in den betroffenen Regionen der je 15 ausgewählten Varianten der Banken 5H und 7/1 wurde eine Sequenzierung der ausgetauschten DNA-Segmente der AS-Gene durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.16). Zwei der Klone (V09 und V25) stellten sich als Gemische von jeweils zwei unterschiedlichen Transformanten heraus. In V05 wurde eine ungewollte Mutation der AA190 (Asn190Ser) festgestellt. Alle anderen Sequenzen wiesen ausschließlich Mutationen auf, die durch die Verwendung der degenerierten Oligonucleotide eingeführt wurden. Die Varianten V12 und V26 ergaben auf Anhiob keine auswertbare Sequenz und wurden aufgrund der Vorergebnisse nicht weiter behandelt.

Die Anzahl von AA-Austauschen in Bank 5H variierte zwischen einem und vier (siehe Tab. 38). Die durchschnittliche Zahl pro Klon lag bei 2,0, was deutlich weniger als der aus einer Reihe zufällig gewählter Klone ermittelte Wert von 3,7 ist. Eine Selektion auf Klone mit durchschnittlich geringerer Anzahl von Austauschen konnte erwartet werden, da normalerweise mit steigender Anzahl von Austauschen auch die Menge inaktiver Varianten zunimmt. Vier der erzeugten Austausche hätten schwer durch natürliche Evolution stattfinden können, da sie zwei Mutationen innerhalb eines Codons benötigten. Die Verteilung der Substitutionen innerhalb der Region war äußerst ungleich. Abhängig von der AA-Position ergaben sich deutliche Unterschiede in der Häufigkeit der Austausche. Im Vergleich zur Austauschrate bei zufällig ausgewählten Klonen (Daten nicht gezeigt) war die Zahl der Austausche bei den ausgewählten Varianten in den Positionen 390 und 395 stark verringert; sie war mittelmäßig reduziert für die Positionen

391 und 394; sie war jedoch nicht im geringsten verringert für Position 396. Offenbar scheinen viele Austausche dieser AA die Selektionskriterien hohe verbleibende katalytische Aktivität, gepaart mit dem Verlust der Elongationsfähigkeit, zu erfüllen.

Tab. 38. AA-Sequenzen von ausgewählten Varianten von Bank 5H

Variante	Region5 390.....396	Zahl der Substitutionen
WT	RSHDDIG	
V16	RCHDDIE	2
V17	RKHDDIA	2
V18	RSHDDID	1
V19	RSHDEIA	2
V20	RSHDDID	1
V21	CSHDDYS	3
V23	RIHDEIS	3
V24	RSHDEIV	2
V25-1	RSHDDID	1
V25-2	RSHDTLD	3
V27	RCHDEVS	4
V28	RSHDDIA	1
V29	RSHDDID	1
V30	RSHDEIS	2

Unterstrichene AAn wurden nicht mutagenisiert.
Substituierte AAn sind schwarz hervorgehoben.

Von sechs möglichen AAn, die durch eine einzelne Mutation im Codon 396 erreicht werden konnten, wurden vier gefunden. Außerdem enthielt die Variante V16 einen Glu-Rest an dieser Stelle, als Folge von zwei Nucleotid-Austauschen in diesem Codon. Eine weitere beachtenswerte statistische Besonderheit ist das Auftreten von fünf Glu-Resten unter den sechs Substitutionen, die an Position 394 gefunden wurden. In einigen Klonen waren die Austausche Gly396Ala bzw. Gly396Asp die einzigen Änderungen, so dass diese Substitutionen allein für die neuen Eigenschaften verantwortlich sein müssen.

Tab. 39. AA-Sequenzen von ausgewählten Varianten von Bank 7/1

Variante	Region7 132.....136	Region1 143.....148	Zahl der Substitutionen (Region 7/1)
WT	LMPLF	SDGGYA	
V01	LISLF	SDGGYA	2/0
V02	LMPQF	SDGGYA	1/0
V03	LMPLF	SDGGCP	0/2
V04	LMPLV	SDGGYA	1/0
V05 ¹⁾	LIPLF	SDGVYA	1/1
V06	LMPVL	SDGGYA	2/0
V07	LLPLF	SDGGYG	1/1
V08	LMLVF	RDGGYT	2/2
V09-1	LMPLF	SDGGNA	0/1
V09-2	LMPLS	SDGGYA	1/0
V10	LMAVF	SDGGYV	2/1
V11	LMPLF	SDGRYA	0/1
V13	LLPVF	SDGGYA	2/0
V14	LMPLF	SDGG*A	0/1
V15	LMPLF	IDGGYA	0/1

Unterstrichene AAn wurden nicht mutagenisiert.
Substituierte AAn sind schwarz hervorgehoben.

¹⁾ Zusätzlicher AA-Austausch Asn190Ser.

* = Stopp-Codon.

Tab. 39 zeigt die Ergebnisse für die ausgewählten Varianten der Bank 7/1. Die durchschnittliche Zahl von AA-Austauschen pro Klon (Region 7 bzw. 1: 1,0 bzw. 0,7) lag jeweils leicht unter den Werten, die aus einer Reihe zufällig gewählter Klone ermittelt worden waren (Region 7 bzw. 1: 1,1 bzw. 0,9, vergl. Tab. 30). Aus dem für Bank 5H oben genannten Grund war dieses Ergebnis nicht unerwartet. Da die durchschnittliche Zahl von AA-Austauschen der zufällig ausgewählten Klone mit 2,0 jedoch deutlich geringer war als bei Bank 5H (3,7), machte sich dieser Effekt bei den Varianten von Bank 7/1 wahrscheinlich nicht so deutlich bemerkbar.

Auffälligerweise wurden für die Positionen Leu132 und Gly145 keine AA-Austausche gefunden. Met133 wurde jeweils zweimal durch Ile bzw. Leu, also zwei strukturell sehr ähnliche AAn ersetzt, jedoch nicht durch eine der vier weiteren AAn, die durch einen einzigen NT-Austausch erreicht werden konnten. Leu135 wurde viermal (von fünf Austauschen insgesamt) gegen Val, ebenfalls eine strukturell sehr ähnliche AA, ausgetauscht. V14 hat an Position 147 ein Stopp-Codon. Aufgrund einer schwachen, aber deutlich messbaren AS-Aktivität kann man vermuten, dass das Stopp-Codon durch eine Suppressor-tRNA teilweise „überlesen“ wird und ein funktionsfähiges Enzym entsteht. In der SDS-PAGE ließ sich zwar kein verkürztes (ca. 18,2 kDa) aber immerhin sehr schwach ein Enzym mit voller Länge nachweisen.

3.3.5. Reinigung und Charakterisierung ausgewählter Varianten

Für eine genauere Charakterisierung einiger ausgewählter Polymer-defizienter Varianten der Banken 5H (V16, V17, V19, V20 und V28) und 7/1 (V05 und V07) wurden diese zusammen mit dem WT für die Aufreinigung in größerem Maßstab kultiviert.

3.3.5.1. Kultivierung, Lyse und Reinigung ausgewählter Varianten

Die Kultivierung und Lyse (French Press) der Proben wurde wie in Kapitel 2.4.3 und 2.4.4.2 durchgeführt. Die Reinigung erfolgte über eine Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 2.5 und 3.1.2.4). Als Aufbewahrungspuffer wurde 1x PBS mit 1 mM EDTA und 1 mM DTT (Aufbewahrungspuffer 2) eingesetzt. Da Glycerin als Akzeptor für AS dient (siehe 3.1.3.3.3), wurde den Enzymen kein Glycerin zugesetzt. Die AS-Konzentrationen wurden auf ca. 1 mg/ml eingestellt.

3.3.5.2. Standard-Aktivitätstest ausgewählter Varianten der Bank 5H mit verschiedenen Substraten

Die Aktivität der einzelnen Varianten wurde mit Sac als einzigem Substrat, mit Arbutin, α -MeG1 bzw. Glycogen als Akzeptoren und ansonsten unter Standard-Bedingungen (Kapitel 3.1.2.5) gemessen. Verglichen wurden dabei die Tra-, die Hyd- und die Total-Aktivität sowie der Hydrolyse-Anteil der Reaktionen. Die Protein-Konzentrationen der Varianten sind in Kapitel 2.8.8.1 angegeben. Für eine gegebene AS wurde in allen Tests dieselbe Enzym-Konzentration eingesetzt. Die Versuchsbedingungen entsprachen jeweils denen aus Kapitel 3.1.3.1.1 (WT).

Es wurden signifikante Unterschiede in den Aktivitäten zwischen WT und den meisten Varianten unter Standard-Bedingungen gefunden, sowohl mit Sac als einzigem Substrat, als auch in Gegenwart von potentiellen Akzeptor-Molekülen. Einen graphischen Überblick über alle Ergebnisse gibt Abb. 41 (Seite 94).

3.3.5.2.1. Saccharose als einziges Substrat

Die Wiederholung der bereits mit den Zellextrakten beschriebenen Experimente mit gereinigtem Enzym (Tab. 40) bestätigte größtenteils die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.4.2.1. Ohne Zusatz eines Akzeptors war fast die gesamte Aktivität beim WT und bei allen Varianten hydrolytisch. Lediglich V16 und V17 zeigten mehr als Spuren von Transglucosylierungs-Aktivität. Dieselben Varianten besaßen auch die höchste Hydrolyse-Aktivität unter diesen Bedingungen. Da Glc den primären Akzeptor für die anschließende Transglucosylierung darstellt, trägt deren schnellere hydrolytische Bildung durch V16 und V17 sehr wahrscheinlich zur erhöhten Transfer-Aktivität bei. Alle Varianten zeigten ähnliche oder (bis zu neunfach) höhere Hydrolyse-Aktivität als der WT. Beim Glucosyltransfer besaßen mit Ausnahme von V19, für die keine Transglucosylierung gemessen wurde, alle Varianten gleiche oder (bis zu 30-fach) höhere Aktivität als der WT.

Tab. 40. Spezifische Aktivität ausgewählter Polymer-negativer AS-Varianten der Bank 5H mit Saccharose als einzigem Substrat

AS	Spezifische Aktivität [U/g]						Hydrolyse-Anteil [%]
	Total		Tra		Hyd		
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
WT	421	9	14,4	4,8	407	10	96,6
V16	3850	151	199	22	3650	171	94,8
V17	2200	192	477	30	1720	163	78,3
V19	825	20	-7,6	5,3	832	16	101
V20	898	16	30,2	3,6	868	13	96,6
V28	559	9	41,0	1,8	518	8	92,7

Sac-Konzentration 146 mM.

3.3.5.2.2. Saccharose und Glycogen als Substrate

Die Zugabe von 0,1 g/l Glycogen erhöhte die Transfer-Aktivität des WT ca. 600-fach, während die hydrolytische Aktivität unverändert blieb (siehe Tab. 41). Auch bei den Varianten wurde letztere nicht geändert. In Bezug auf die Steigerung der Tra-Aktivität unterschieden sie sich allerdings drastisch vom WT. Die höchste gemessene Zunahme der Transglucosylierung war lediglich eine 23-fache (V28). Bei V16, V17 und V20 lag dieser Wert zwischen 1,2 und 3,2. V19, bei der mit Sac alleine keine Glc-Übertragung gemessen werden konnte, zeigte eine schwache Aktivität, ähnlich der von V20. Diese Verhaltensweisen der Varianten stimmten mit den bei der Selektion angelegten Kriterien überein.

Tab. 41. Spezifische Aktivität ausgewählter Polymer-negativer AS-Varianten der Bank 5H mit Saccharose und Glycogen als Substrate

AS	Spezifische Aktivität [U/g]						Hydrolyse-Anteil [%]
	Total		Tra		Hyd		
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
WT	8890	135	8460	127	421	8	4,74
V16	4290	240	247	6	4050	235	94,3
V17	3170	153	1510	79	1660	74	52,3
V19	818	19	30,3	6,9	787	20	96,3
V20	892	24	38,4	6,7	854	31	95,7
V28	1480	32	949	25	527	8	35,7

Sac-Konzentration 146 mM, Glycogen-Konzentration 0,1 g/l.

3.3.5.2.3. Akzeptoren mit Glucose-Anteil im Molekül

Die Zugabe von 146 mM α -MeG1 in die Reaktion steigerte die Transfer-Aktivität des WT ca. 500-fach. Die hydrolytische Aktivität blieb unverändert. Eine vergleichbare Stimulation des Glc-Transfers wurde für V20 und V28 beobachtet (siehe Tab. 42). Sie war ca. zehnmal geringer für V16 und V17, die bereits eine relativ hohe Transfer-Aktivität in Abwesenheit eines Akzeptors besaßen. In absoluten Werten zeigten bis auf V19 alle Varianten eine ähnliche oder höhere spezifische Transfer-Aktivität als der WT. Die Transfer-Aktivität von V19 wurde mit α -MeG1 von unterhalb der Nachweisgrenze von ca. 20 U/g auf 1000 U/g gesteigert.

Tab. 42. Spezifische Aktivität ausgewählter Polymer-negativer AS-Varianten der Bank 5H mit Saccharose und α -MeG1 als Substrate

Bank 31 mit Saccharose und α-MeG als Substrate							
AS	Spezifische Aktivität [U/g]						Hydrolyse-Anteil [%]
	Total		Tra		Hyd		
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
WT	7490	74	7110	70	380	5	5,07
V16	11500	452	8350	308	3160	128	27,4
V17	16700	410	16100	400	572	9	3,42
V19	1780	27	1050	14	730	11	41,1
V20	14800	133	14100	139	694	55	4,68
V28	19500	418	19000	411	475	7	2,44

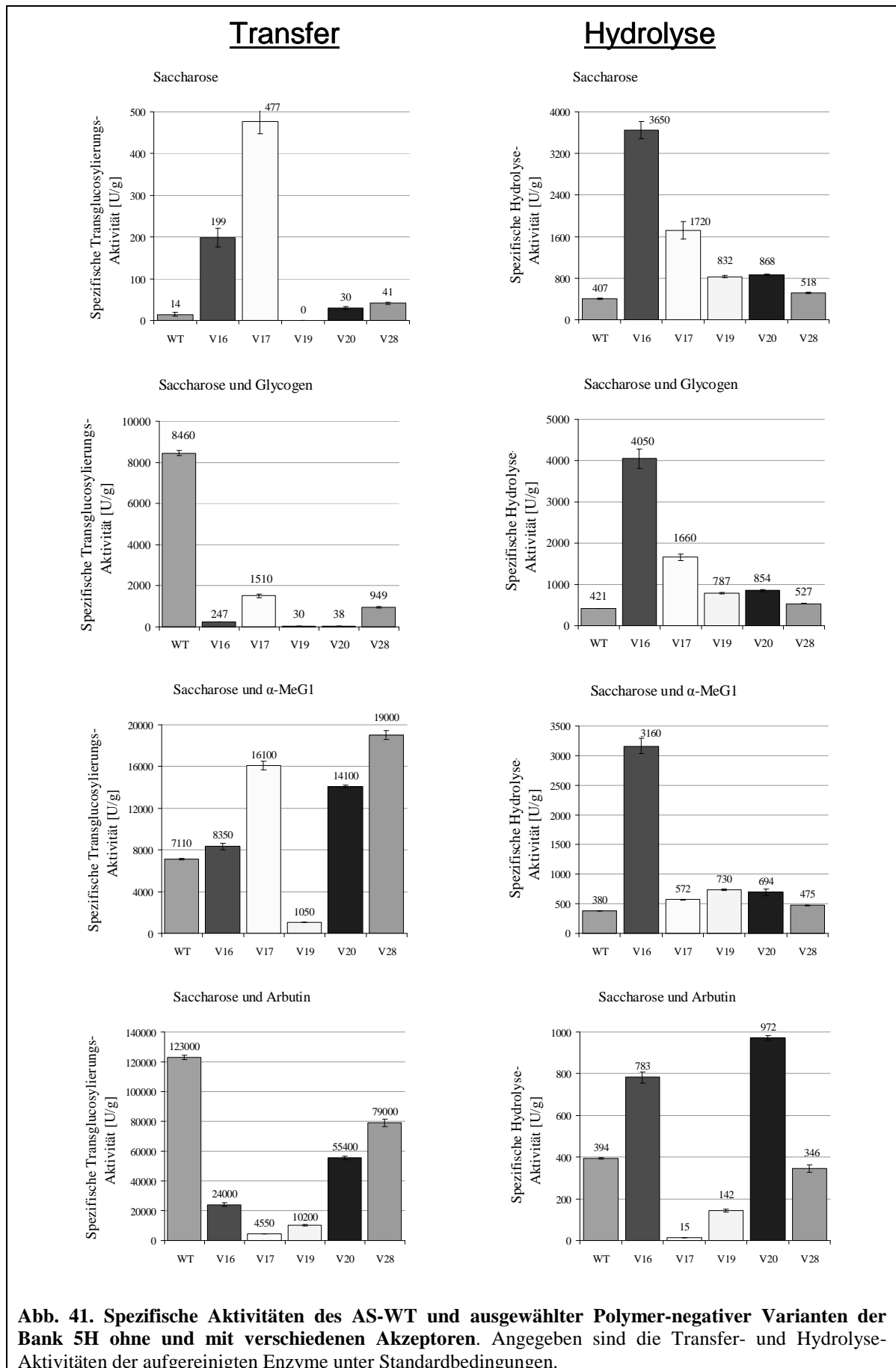
Sac- bzw. α -MeG1-Konzentration je 146 mM.

Die Zugabe von 146 mM Arbutin erhöhte die Transglucosylierungs-Rate des WT 8500-fach bei unveränderter hydrolytischer Aktivität. Eine vergleichbare Stimulation des Glc-Transfers wurde für V20 und V28 beobachtet (siehe Tab. 43). Sie war ca. zehnmal geringer für V16. V17 und V19 zeigten die geringste Aktivität mit diesem Akzeptor. Bei den Varianten V16, V17 und V19 wurde ein deutlicher Rückgang der Hydrolyse-Aktivität festgestellt, für V16 und V19 um das fünf- bis sechsfache, für V17 sogar um das ca. 100-fache im Vergleich zu den Werten in Abwesenheit eines Akzeptors. Der zuletzt genannte Wert stellte mit Abstand die deutlichste Verringerung der Hydrolyse-Aktivität durch Zugabe eines Akzeptors dar. Arbutin war für alle Varianten mit Ausnahme von V17 ein besserer Akzeptor als α -MeG1 (siehe oben). Die absolute Aktivität war bei allen Varianten kleiner als beim WT.

Tab. 43. Spezifische Aktivität ausgewählter Polymer-negativer AS-Varianten der Bank 5H mit Saccharose und Arbutin als Substrate

Bank 31 mit Saccharose und Arabin als Substrate							
AS	Spezifische Aktivität [U/g]						Hydrolyse-Anteil [%]
	Total		Tra		Hyd		
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
WT	124000	1300	123000	1300	394	4	0,32
V16	24700	1330	24000	1310	783	26	3,17
V17	4560	65	4550	65	14,9	0,2	0,33
V19	10400	480	10200	477	142	6	1,37
V20	56100	1340	55400	1330	972	12	1,73
V28	79300	2300	79000	2310	346	17	0,44

Sac- bzw. Arbutin-Konzentration je 146 mM.



3.3.5.3. Standard-Aktivitätstest ausgewählter Varianten der Bank 7/1 mit verschiedenen Substraten

Die Versuchsbedingungen entsprachen den für Bank 5H beschriebenen (siehe Kapitel 3.3.5.2 ff). Verglichen wurden ebenfalls die Tra-, die Hyd- und die Total-Aktivität sowie der Hydrolyse-Anteil der Reaktionen. Die Protein-Konzentrationen der Varianten sind in Kapitel 2.8.8.1 angegeben. Für eine gegebene AS wurde in allen Tests dieselbe Enzym-Konzentration eingesetzt.

WT und Variante V05 zeigten unter Standard-Bedingungen deutliche Unterschiede in den Aktivitäten, sowohl mit Sac als einzigem Substrat, als auch in Gegenwart von potentiellen Akzeptor-Molekülen. Einen graphischen Überblick über alle Ergebnisse zeigt Abb. 42 (Seite 97). Auch WT und Variante V07 wiesen zum Teil unterschiedliche Aktivitäten auf, jedoch weit weniger stark divergierend.

3.3.5.3.1. Saccharose als einziges Substrat

In Tab. 44 sind die spezifischen Aktivitäten der beiden Varianten und des WT mit Sac als einzigem Substrat angegeben. Die Variante V05 zeigte ohne Zusatz möglicher Akzeptoren keine Transglucosylierung- und fast keine Hydrolyse-Aktivität. Die Werte von V07 waren dagegen fast doppelt so hoch wie beim WT.

Tab. 44. Spezifische Aktivität ausgewählter Polymer-negativer AS-Varianten der Bank 7/1 mit Saccharose als einzigem Substrat

Bank 7/1 mit Saccharose als einzigem Substrat							
AS	Spezifische Aktivität [U/g]						Hydrolyse-Anteil [%]
	Total		Tra		Hyd		
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
WT	421	9	14,4	4,8	407	10	96,6
V05	9,0	0,3	-1,8	5,4	10,8	1,3	120
V07	819	16	27,5	14,8	791	18	96,6

Sac-Konzentration 146 mM.

3.3.5.3.2. Saccharose und Glycogen als Substrate

Bei Zugabe von 0,1 g/l Glycogen erhöhte sich die Transfer-Aktivität bei beiden Varianten, ähnlich wie beim WT, beträchtlich (siehe Tab. 45). Dies unterschied V05 und V07 deutlich von den Varianten der Bank 5H (siehe 3.3.5.2.2). Die Transfer-Aktivität von V07 wurde mit Glycogen etwa 150-fach, die von V05 von unterhalb der Nachweisgrenze von ca. 2,5 U/g auf 3400 U/g gesteigert. In absoluten Werten erreichten so beide Varianten knapp die Hälfte der WT-Aktivität. Die Hydrolyse-Aktivität blieb jeweils unverändert. V05 hatte unter diesen Bedingungen mit unter 1 % den mit Abstand geringsten Hydrolyse-Anteil aller gemessenen Varianten.

Tab. 45. Spezifische Aktivität ausgewählter Polymer-negativer AS-Varianten der Bank 7/1 mit Saccharose und Glycogen als Substrate

Spezifische Aktivität [U/g]								Hydrolyse- Anteil [%]
AS	Total		Tra		Hyd			
	MW	SA	MW	SA	MW	SA		
WT	8890	135	8460	127	421	8	4,74	
V05	3420	37	3390	34	30,5	3,9	0,89	
V07	4590	76	3860	67	725	47	15,8	

Sac-Konzentration 146 mM, Glycogen-Konzentration 0,1 g/l.

3.3.5.3.3. Akzeptoren mit Glucose-Anteil im Molekül

Die Zugabe von 146 mM α -MeG1 in die Reaktion steigerte die Transfer-Aktivität der V07 in ähnlicher Weise wie die des WT (siehe Tab. 46). Der absolute Wert für V07 lag etwa 1,5-fach höher. V05 zeigte dagegen nur eine äußerst geringe Stimulation und zugleich den geringsten absoluten Wert aller gemessenen Varianten. Die Hydrolyse-Aktivität sank unter die Nachweisgrenze von ca. 10 U/g.

Tab. 46. Spezifische Aktivität ausgewählter Polymer-negativer AS-Varianten der Bank 7/1 mit Saccharose und α -MeG1 als Substrate

AS	Spezifische Aktivität [U/g]						Hydrolyse-Anteil [%]
	Total		Tra		Hyd		
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
WT	7490	74	7110	70	380	5	5,07
V05	285	3	305	5	-20,3	0,2	-7,14
V07	11000	176	10420	164	608	10	5,51

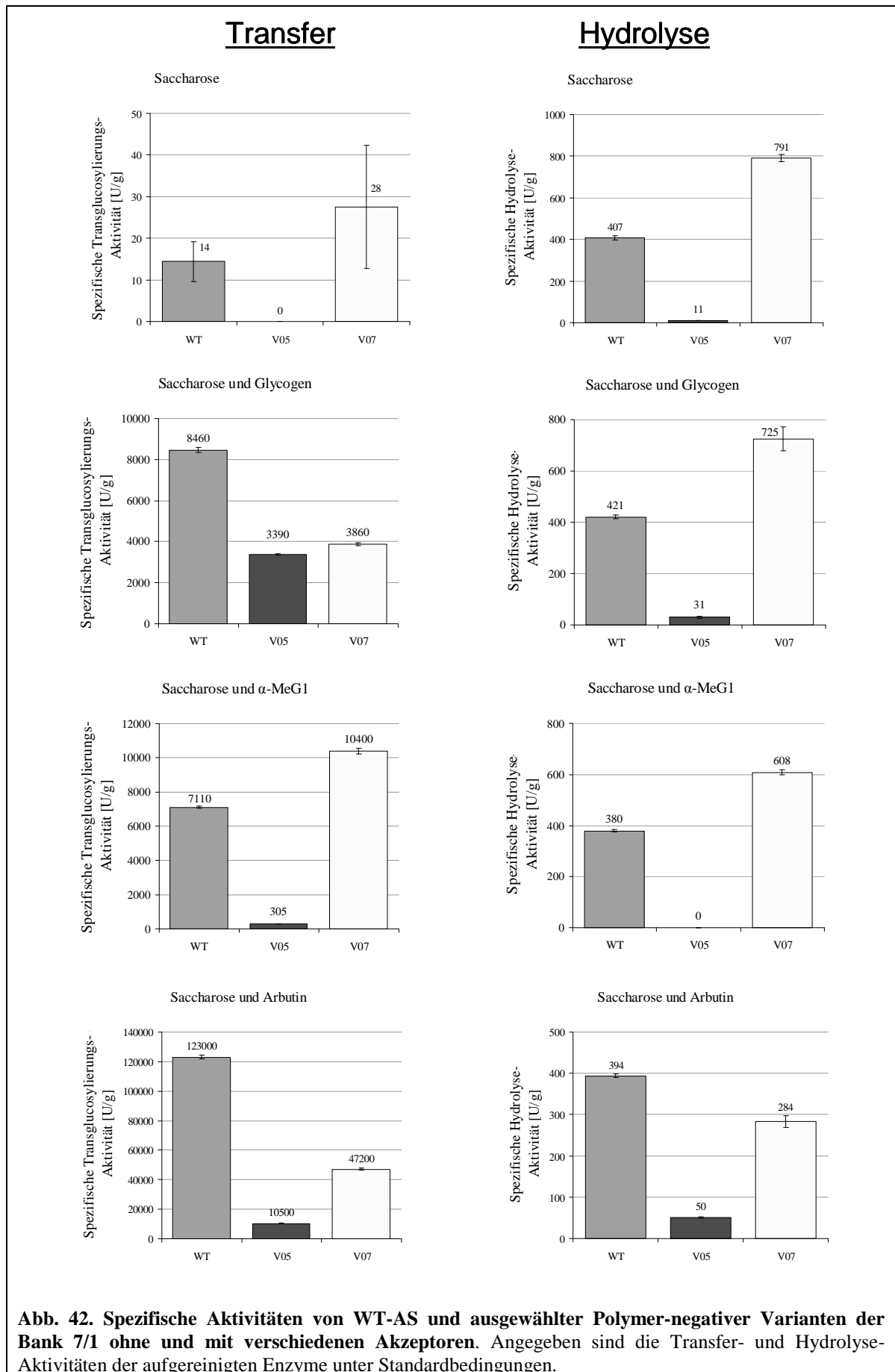
Sac- bzw. α -MeG1-Konzentration je 146 mM.

In Tab. 47 sind die spezifischen Aktivitäten der beiden Varianten und des WT mit Sac und Arbutin als Substrate angegeben. Die Transglucosylierungs-Rate stieg durch Zugabe dieses Akzeptors bei V07 etwa fünffmal weniger stark als beim WT, der absolute Wert war ungefähr ein Drittel so hoch. Die Hydrolyse-Aktivität sank auf etwa ein Drittel im Vergleich zur Reaktion mit Sac als einzigem Substrat. Im Vergleich zu α -MeG1 steigerte der Akzeptor Arbutin die Transfer-Aktivität von V05 über 30-fach stärker. Ebenfalls leicht gesteigert wurde die Hydrolyse-Aktivität.

Tab. 47. Spezifische Aktivität ausgewählter Polymer-negativer AS-Varianten der Bank 7/1 mit Saccharose und Arbutin als Substrate

AS	Spezifische Aktivität [U/g]						Hydrolyse- Anteil [%]
	Total		Tra		Hyd		
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	
WT	124000	1300	123000	1300	394	4	0,32
V05	10500	119	10450	121	50,2	1,5	0,48
V07	47400	689	47200	681	284	14	0,60

Sac- bzw. Arbutin-Konzentration je 146 mM



3.3.5.4. Produktmuster ausgewählter Varianten der Bank 5H mit verschiedenen Substraten

Die Produktbildung unter verschiedenen Bedingungen wurde per DC und HPLC (im Falle von Arbutin) analysiert.

3.3.5.4.1. Umsatz von Saccharose ohne bzw. mit Arbutin oder α -MeG1 als Akzeptor

Die Versuchsbedingungen entsprachen denen für den WT in Kapitel 3.1.3.3.2. Die Protein-Konzentrationen der Varianten sind in Kapitel 2.8.8.2 angegeben. Für eine gegebene AS wurde in allen Tests dieselbe Enzym-Konzentration eingesetzt.

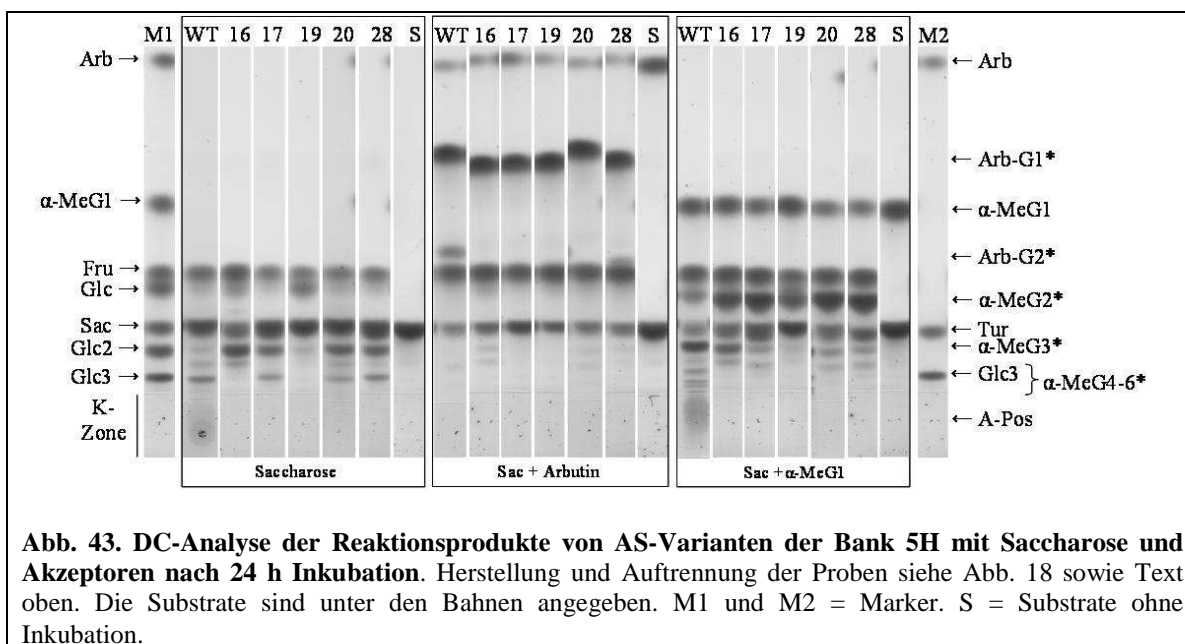


Abb. 43. DC-Analyse der Reaktionsprodukte von AS-Varianten der Bank 5H mit Saccharose und Akzeptoren nach 24 h Inkubation. Herstellung und Auftrennung der Proben siehe Abb. 18 sowie Text oben. Die Substrate sind unter den Bahnen angegeben. M1 und M2 = Marker. S = Substrate ohne Inkubation.

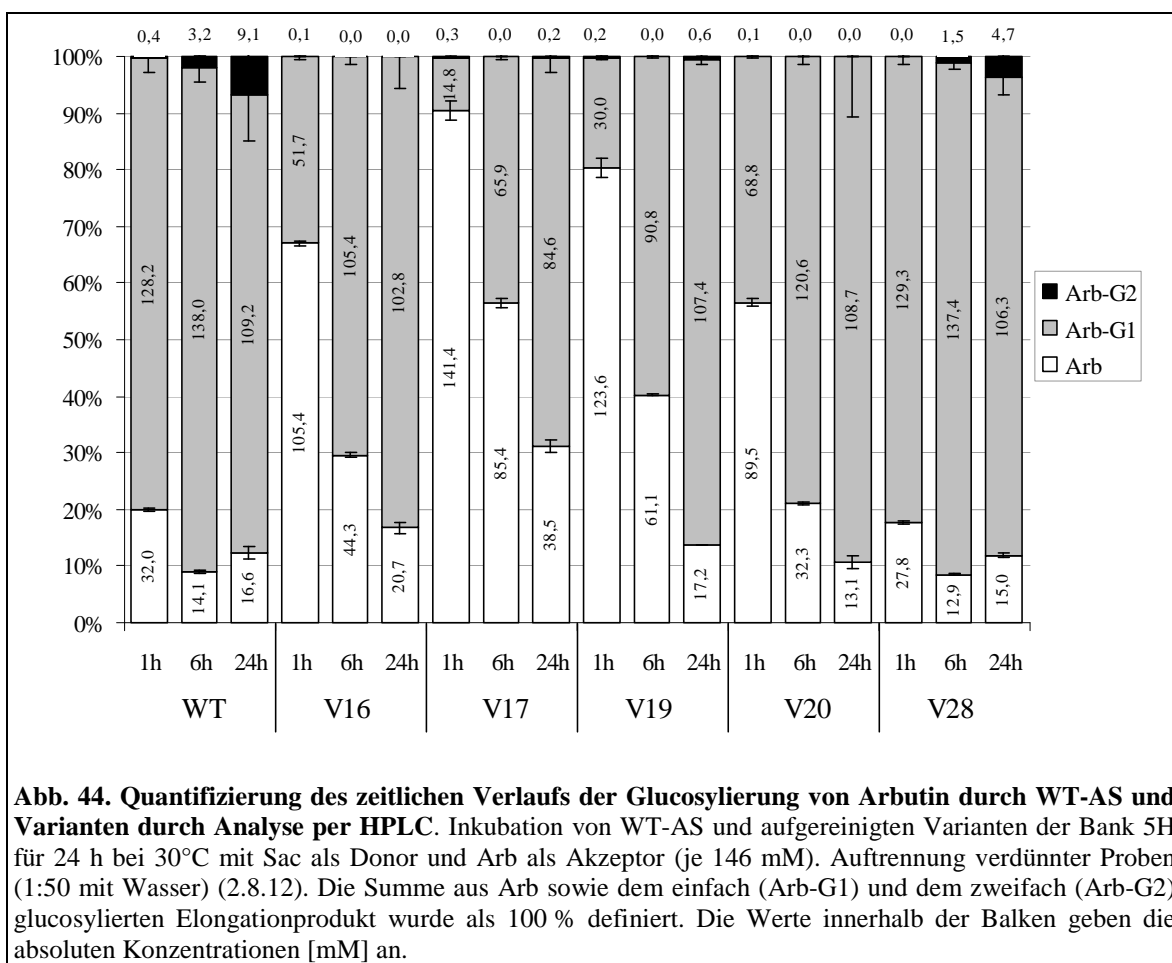
Abb. 43 zeigt die Reaktionsprodukte des Sac-Umsatzes durch WT und Varianten ohne und mit den Akzeptoren Arbutin und α -MeG1. Mit Sac als einzigem Substrat bestätigten diese Experimente größtenteils die Ergebnisse mit den Zellextrakten (siehe Abb. 37). Keine der fünf Varianten erzeugte ein Produkt mit mehr als drei Glc-Einheiten. Mit V16 entstand fast ausschließlich Glc2. V20 produzierte Glc2 und wenig Glc3. Ähnlich, aber mit relativ mehr Glc3-Produkt verhielten sich V17 und V28. Bei V19 war fast ausschließlich Hydrolyse zu sehen.

Bei Zugabe von Arbutin bildeten alle Varianten fast ausschließlich das einfach glucosylierte Elongationsprodukt mit diesem Akzeptor. Zugleich wurde die Bildung von Maltooligosacchariden mit zwei und mehr Glc-Einheiten sowie von Sac-Isomeren nahezu vollständig unterdrückt. Neben dem WT wurde nur von V28 ein zweiter Glc-Rest auf Arbutin übertragen. Der Transfer von drei und mehr Glc-Resten auf Arbutin fand augenscheinlich bei keiner Variante statt.

Die Resultate bei Zugabe des Akzeptors α -MeG1 bestätigten ebenfalls die Ergebnisse mit den Zellextrakten (siehe Abb. 38). Anders als beim WT war bei keiner Variante die Bildung von in der K-Zone verbleibenden Oligomeren, die länger als α -MeG3 waren, zu beobachten. Die fünf Varianten nutzten α -MeG1 mit unterschiedlicher Effizienz als Primer-Molekül, am höchsten war sie bei V17, V20 und V28, am niedrigsten bei V19. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Aktivitätstests (siehe 3.3.5.2.3) überein. α -MeG2

war mit allen Varianten das Hauptprodukt. Auch dieser Akzeptor unterdrückte die Bildung unmethylierter Elongationsprodukte.

Die Abb. 44 zeigt den zeitlichen Verlauf der Umsetzung von Arbutin durch WT und AS-Varianten sowie die Elongationsprodukte nach Analyse per HPLC. Die Ergebnisse stimmen mit dem optischen Eindruck der DC (Abb. 43) sowie mit den spezifischen Aktivitäten (Abb. 41) überein. Abgesehen vom WT und V28 bildeten die Varianten maximal Spuren von zweifach glucosyliertem Arbutin. Am langsamsten wurde Arbutin von V17 und V19 glucosyliert. Der leichte Anstieg der Arb-Konzentration nach 24 h beim WT und V28 beruht vermutlich auf einer Disproportionierung von Arb-G1.



3.3.5.4.2. Maltose und Maltotriose als Substrate

Die Defizienz der Varianten, längere Produkte als Glc2 oder Glc3 zu bilden, wurde im Hinblick auf die Nutzung dieser Produkte als mögliche Donor- bzw. Akzeptor-Substrate genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Reaktion mit Glc2 bzw. Glc3 als jeweils einzigem Substrat sowie zusätzlich in Anwesenheit des sehr guten Donors Sac untersucht. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen für den WT in Kapitel 3.1.3.2. Die Protein-Konzentrationen der Varianten sind in Kapitel 2.8.8.2 angegeben. Für eine gegebene AS wurde in allen Tests dieselbe Enzym-Konzentration eingesetzt.

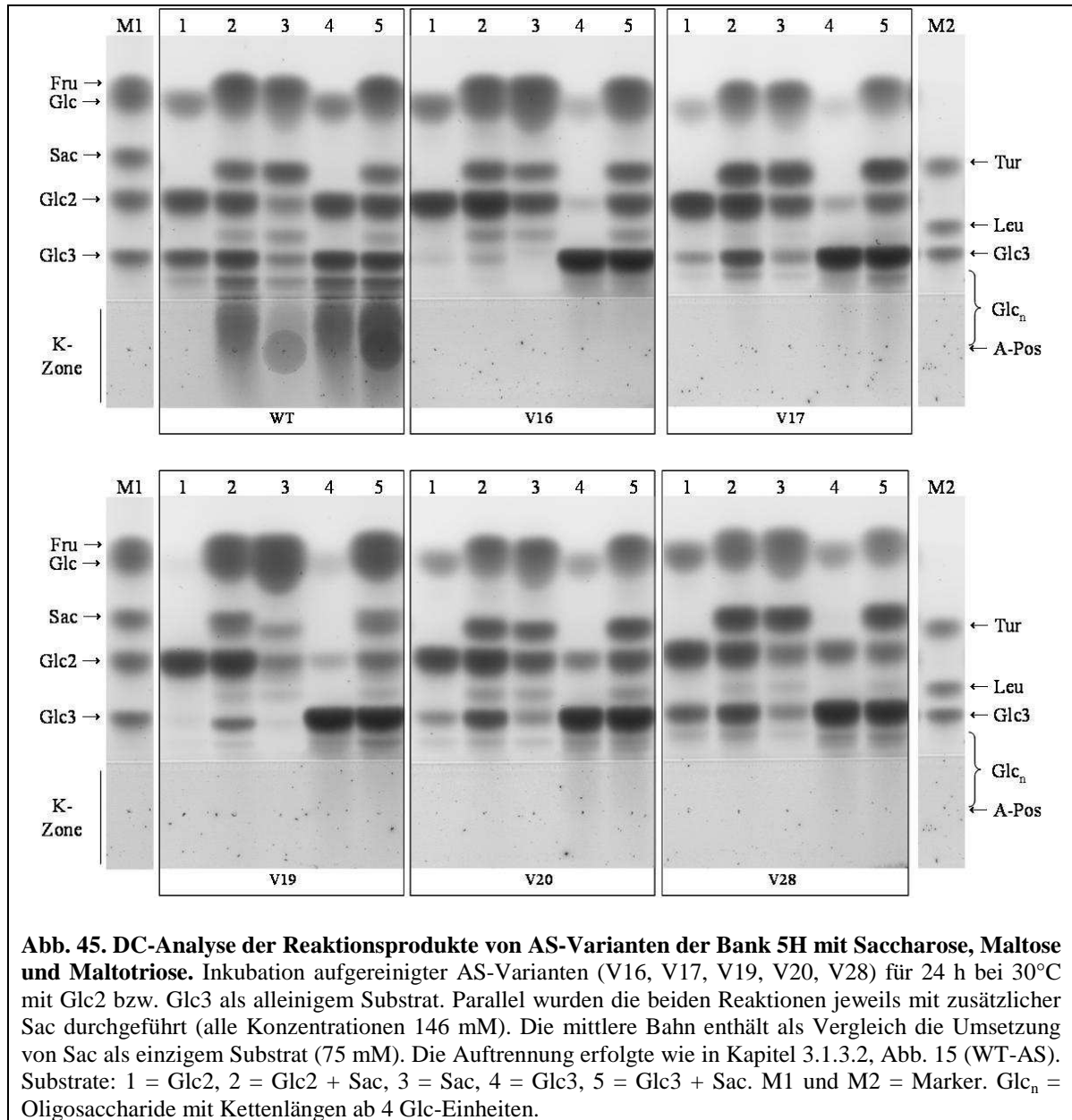


Abb. 45 zeigt die DC-Analyse der Reaktionsprodukte der Varianten mit denen des WT zum Vergleich. Die Variante V16 hydrolysierte zwar Glc2 zu Glc, bildete aber kein Glc3, nutzte das Dimer also offenbar als Donor- aber nicht als Akzeptor-Molekül. Bestätigt wurde dies durch zusätzliche Gabe von Sac in die Reaktion, wobei lediglich Spuren von Glc3 gefunden wurden. In Übereinstimmung mit diesem Befund war Glc3 ein extrem schlechter Donor. Nur geringste Mengen hydrolysierter Produkte waren sichtbar. Auch die Zugabe von Sac erbrachte keine Elongationsprodukte von Glc3. Ähnliche Ergebnisse mit Glc3 zeigte V17, die allerdings Spuren von Glc4 bildete, wenn Sac zugefügt wurde. Glc2 zeigte hier geringere Donor-Funktion als mit V16, diente aber als Akzeptor. Mit V19 konnte bei Glc2 keinerlei Donor-Funktion beobachtet werden. Mit zusätzlicher Sac dagegen fand die Elongation zu Glc3 statt, was mit Sac alleine nicht der Fall war. Für diese Variante ist offenbar die aus Sac gebildete Glc ein äußerst schlechter Akzeptor, während Glc2 diese Funktion weitaus besser übernehmen kann. Ähnlich wie V17 nutzte V19 Glc3 kaum als Donor (Versuch ohne Sac) und Akzeptor (Versuch mit Sac). Für V20 und V28 diente Glc2 als Donor und als Akzeptor, wogegen Glc3 zwar als Donor, jedoch kaum als Akzeptor diente.

3.3.5.5. Produktmuster ausgewählter Varianten der Bank 7/1 mit verschiedenen Substraten

Bedingungen und Analyse entsprachen denen für Bank 5H (siehe Kapitel 3.3.5.4 ff). Die Protein-Konzentrationen der Varianten sind in Kapitel 2.8.8.2 angegeben.

3.3.5.5.1. Umsatz von Saccharose ohne bzw. mit Arbutin oder α -MeG1 als Akzeptor

Die Abb. 46 zeigt die Ergebnisse des ÜN-Umsatzes von Sac ohne bzw. mit Arb oder α -MeG1 für die Varianten V05 und V07. Mit Sac als alleinigem Substrat war mit V05 kein Umsatz nachzuweisen. Für V07 bestätigte sich im Wesentlichen das Ergebnis mit dem Zellextrakt, Hauptprodukte waren Glc3 und Fru-Isomere. Mit Arb als Akzeptor produzierten beide Varianten effektiv Arb-G1, V07 zusätzlich auch Arb-G2. Mit α -MeG1 ergaben sich sowohl für V05 als auch für V07 die gleichen Muster wie mit den Zellextrakten (siehe auch Kapitel 3.3.4.3.2). V05 zeigte insbesondere ohne bzw. mit dem Akzeptor α -MeG1 klare Unterschiede zum WT. V07 unterschied sich dagegen durch die verminderte Bildung von Elongationsprodukten mit mehr als vier bzw. sechs Glc-Einheiten in den beiden genannten Reaktionen vom WT.

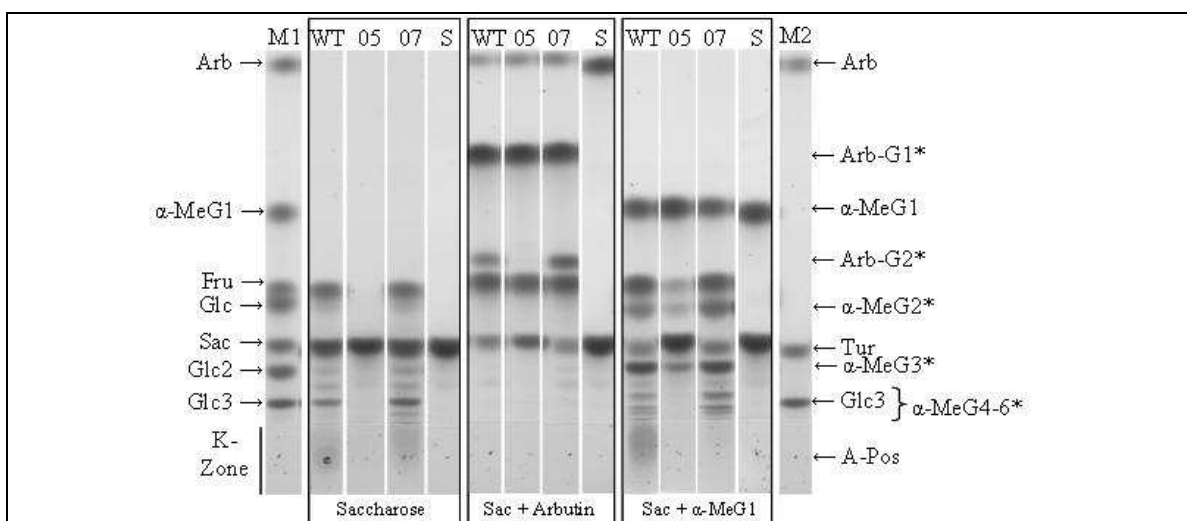
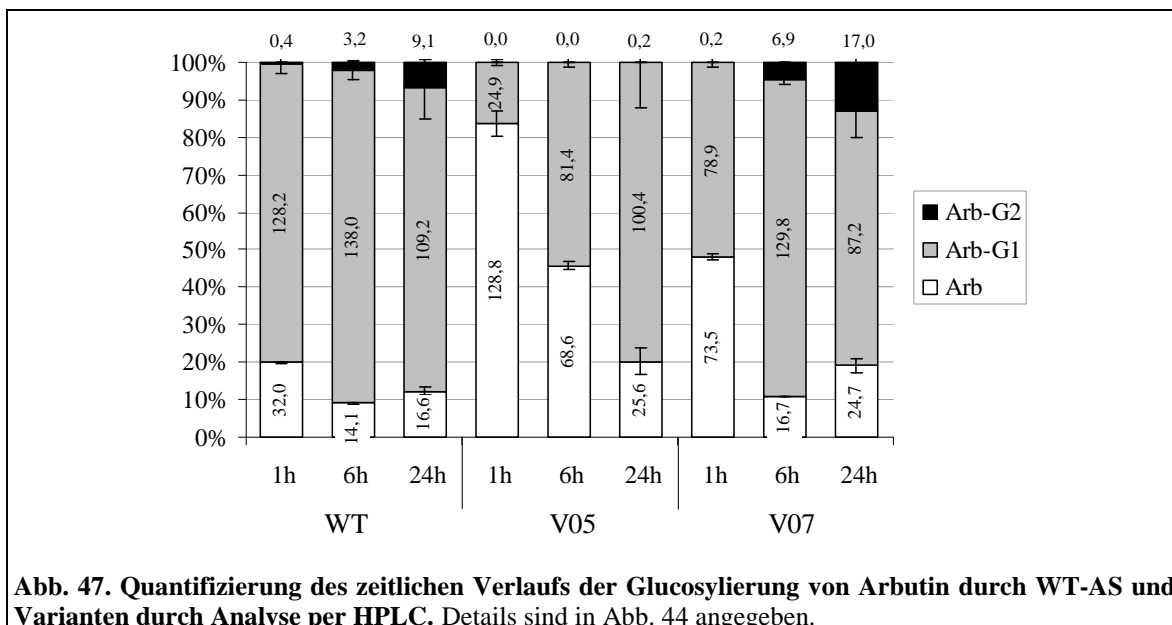


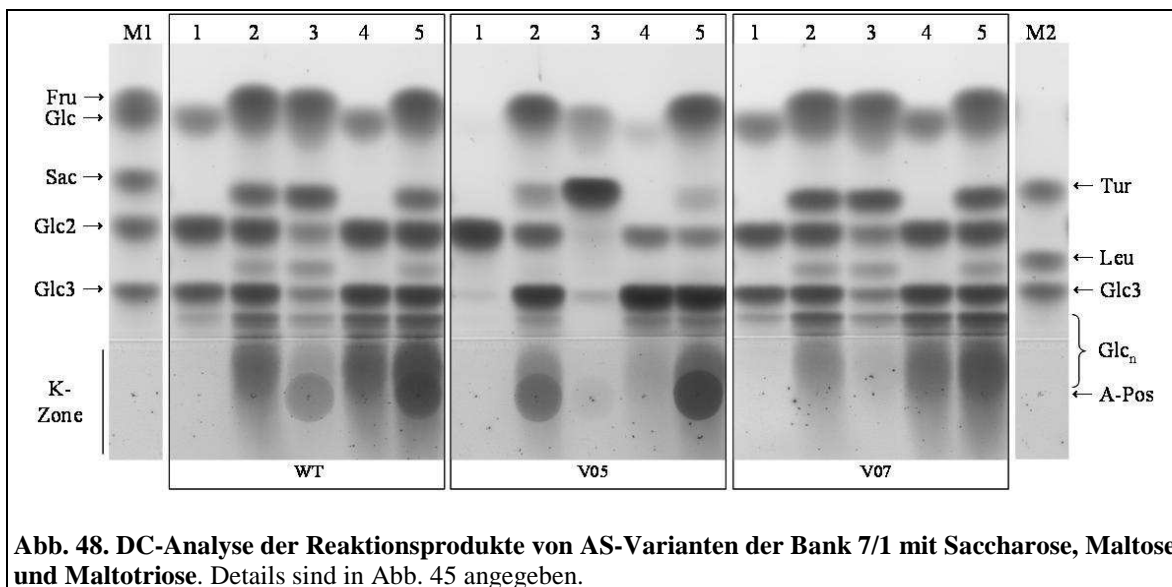
Abb. 46. DC-Analyse der Reaktionsprodukte von AS-Varianten der Bank 7/1 mit Saccharose und Akzeptoren nach 24 h Inkubation. Herstellung und Auftrennung der Proben siehe Abb. 18 sowie 3.3.5.4.1. Die Substrate sind unter den Bahnen angegeben. M1 und M2 = Marker. S = Substrate ohne Inkubation.

Wie für die Varianten der Bank 5H wurden auch für V05 und V07 der zeitliche Verlauf der Umsetzung von Arbutin per HPLC quantifiziert (siehe Abb. 47). Die Ergebnisse bestätigen den optischen Eindruck der DC in Abb. 46 sowie die Ergebnisse für die spezifischen Aktivitäten (Abb. 42). Neben einer relativ zum WT deutlich langsameren Glucosylierung von Arb durch V05 war so gut wie kein zweifach glucosyliertes Arb detektierbar. V07 zeigte ebenfalls eine verlangsamte Übertragungsrate auf diesen Akzeptor. Der Anteil von Arb-G2 war nach 24 h Inkubationsdauer jedoch fast doppelt so hoch wie beim WT.



3.3.5.5.2. Maltose und Maltotriose als Substrate

Analog zu den Varianten von Bank 5H (siehe 3.3.5.4.2) wurde die Nutzung von Glc2 bzw. Glc3 als mögliche Donor- bzw. Akzeptor-Substrate genauer untersucht. Die Protein-Konzentrationen der Varianten sind in Kapitel 2.8.8.2 angegeben.



Die Variante V05 unterschied sich bei der Nutzung von Glc2, Glc3 und Sac als jeweils einziges Substrat deutlich vom WT. Mit Glc2 allein war praktisch kein Umsatz sichtbar, mit Glc3 konnte sowohl geringe Hydrolyse, als auch geringe Mengen von Glc4 und länger-kettigen Oligomeren nachgewiesen werden. Glc3 diente hier also als schwacher Donor sowie als Akzeptor. Bei Zusatz von Sac stieg die Umsatzgeschwindigkeit mit Glc2 und Glc3 stark an, annähernd bis zum Komplettumsatz der Sac. Dabei wurden hauptsächlich Glc3 und länger-kettige Oligomere gebildet. Glc2 und Glc3 dienten augenscheinlich als effiziente Akzeptoren. Mit Sac alleine waren dagegen nur wenig G1 und geringste Mengen von Glc2 und Glc3 sichtbar. Die wesentlich schnellere Produktbildung in Gegenwart von zusätzlich Glc2 oder Glc3 zeigt, dass die langsame Reaktion

mit Sac allein nicht auf langsamer Bildung von AS-Glc, sondern auf langsamer Weiterreaktion dieses Intermediats beruht. Bemerkenswert ist, dass V05 auch bei deutlicher Fru-Bildung (Abb. 48, Ansätze 2 und 5) nie Tre oder Tur bildete.

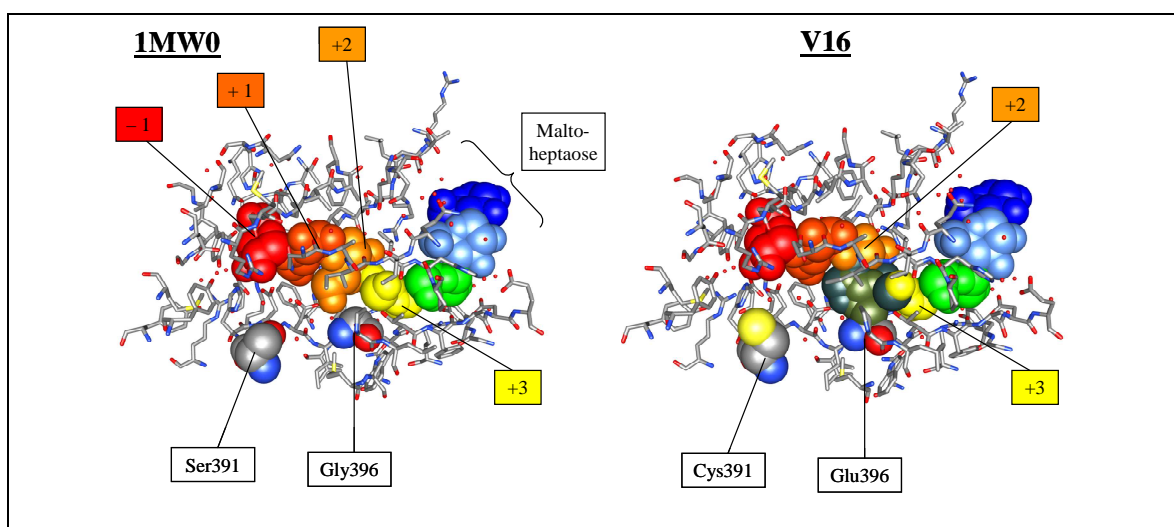
Anders als der WT benötigt diese Variante mit Sac als Donor also zusätzlich einen geeigneten Akzeptor als Kettenstarter. Diese Eigenschaft von V05 resultiert einerseits wahrscheinlich aus der stark verringerten Hydrolyse-Aktivität und der dadurch entsprechend verminderten Freisetzung des „natürlichen“ Startermoleküls Glc sowie andererseits aus einer langsamen Elongation von Glc zu Glc2. Auf letzteres deutet die schlechte Elongation von α -MeG1 hin. Auch Fru scheint, zumindest in den Orientierungen, die zu Tre und Tur führen, nicht oder kaum produktiv an die Akzeptor-Bindungsstelle zu binden. Der Unterschied zum WT bei der Nutzung von Glc2 und Glc3 beruht anscheinend auf der verlangsamten Bildung des AS-Glc-Intermediats, nicht auf dessen langsamer Weiterreaktion, da die Reaktion in Gegenwart von Sac, das seinerseits nicht als Akzeptor fungiert, wesentlich schneller abläuft.

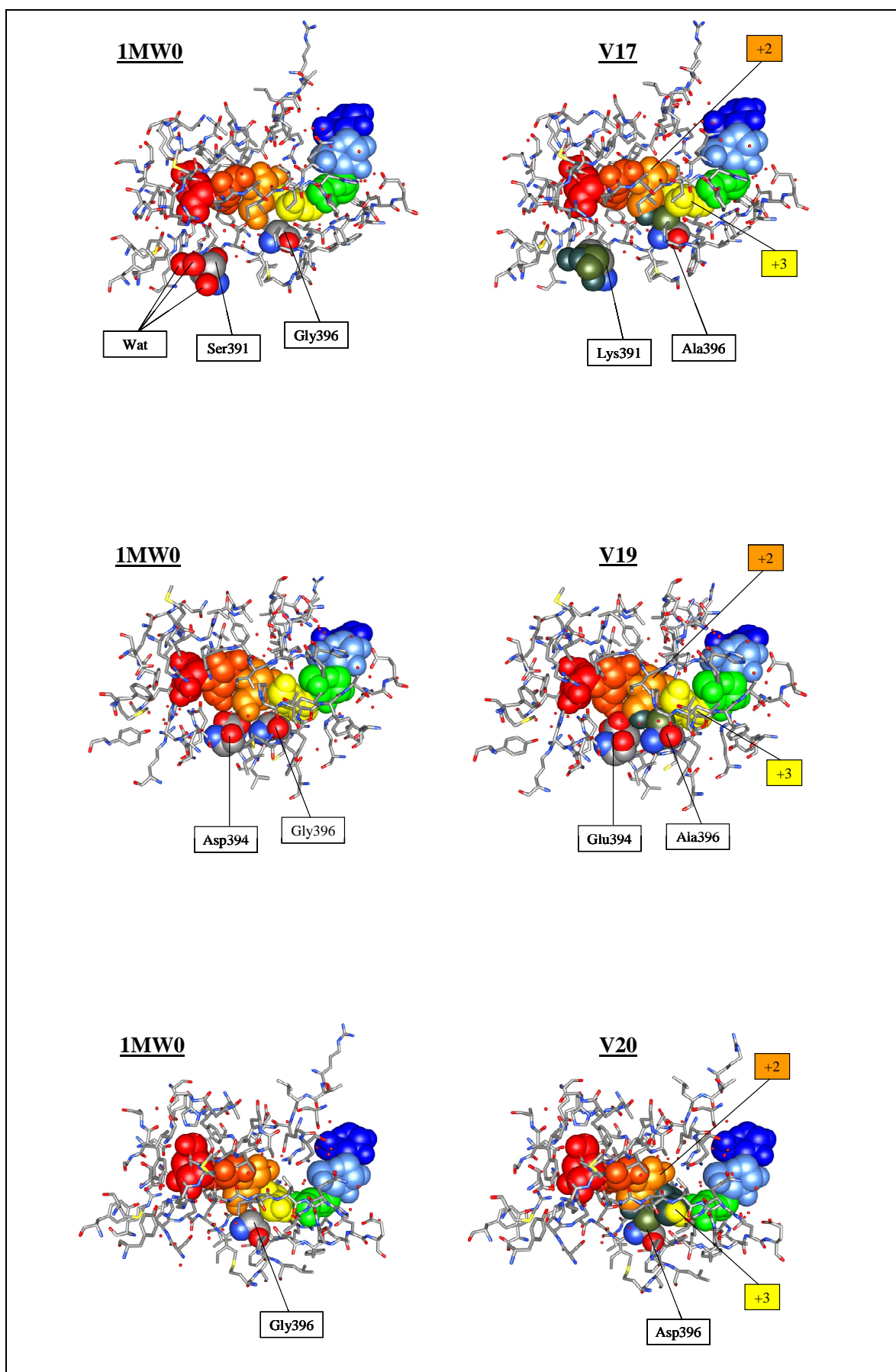
Variante V07 zeigte bei der Nutzung von Glc2 und Glc2 ein sehr WT-ähnliches Produktmuster.

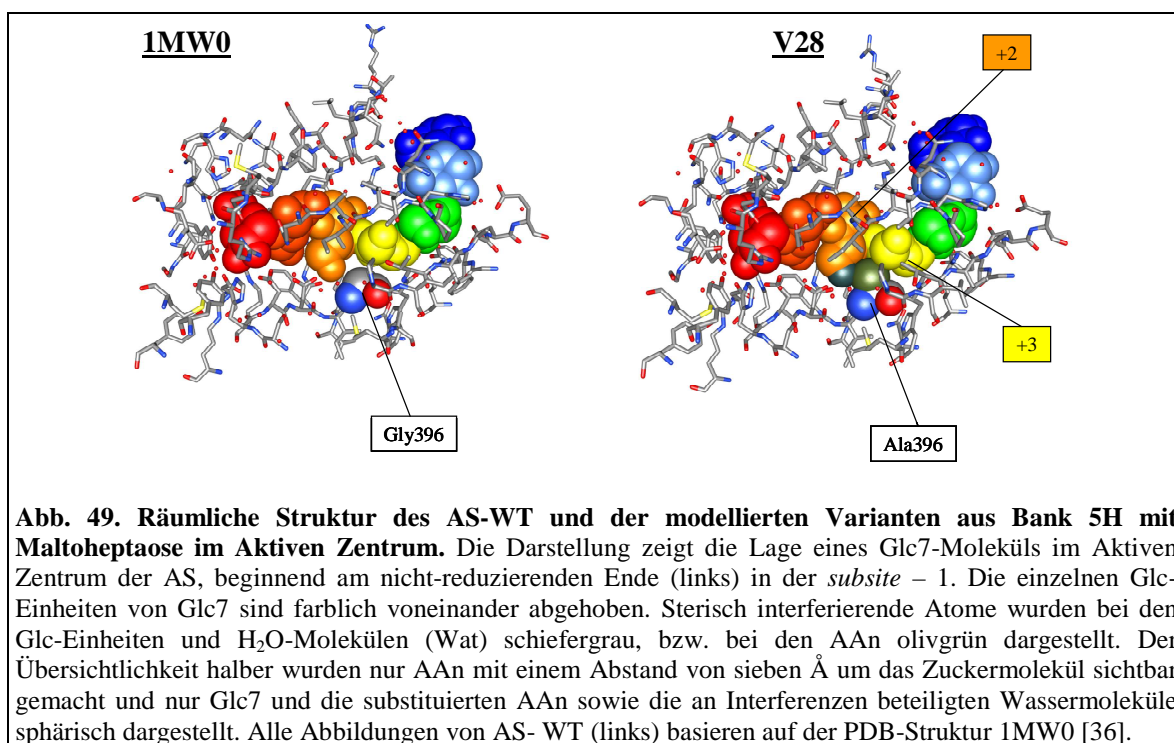
3.3.6. Modellierung der Strukturen ausgewählter Varianten

Die Strukturen der Varianten aus Bank 5H wurden freundlicherweise von Dr. Birgit Hofmann mit dem Programm „Modeller“, Version 6.1 [83,84] modelliert. Als Grundlage dienten die Strukturdaten der inaktiven Variante Glu328Gln mit einem im Aktiven Zentrum gebundenen Glc7-Molekül (1MW0 [36]).

Mit Hilfe der Strukturmodelle der fünf Varianten aus Bank 5H wurde getestet, ob und wo eine mögliche sterische Hinderung bei der Elongation eines Akzeptors vorliegen könnte. Zu diesem Zweck wurden sterische Interferenzen („clashes“) zwischen Atomen der Modelle und der Maltoheptaose sowie Wassermolekülen (Wat) berechnet. Als Ergebnis erhält man Paare von Atomen, die ungünstigen Wechselwirkungen aufgrund eines zu geringen räumlichen Abstands unterliegen. In Abb. 49 wurden die Strukturmodelle den jeweiligen Darstellungen des AS-WT gegenüber gestellt. Die räumlichen Interferenzen zwischen substituierten AAn und Glc7 wurden farblich hervorgehoben.







Tab. 48 zeigt, welche Reste bzw. Wassermoleküle im Einzelnen an diesen sterischen Interferenzen beteiligt sind. Die mit Abstand häufigsten räumlichen Überschneidungen ergaben sich bei V16 zwischen Glu396 und der Glc-Einheit in *subsite* +2 sowie bei V20 zwischen Asp396 und dem Glc-Rest in *subsite* +3. V17, V19 und V28 wiesen für die neu eingeführten Reste jeweils nur eine einzige Kollision mit Glc7 auf, und zwar stets zwischen Ala396 und Glc +2. Bei V17 (Lys391) kam es ferner zu Interferenzen mit drei Wassermolekülen (Wat871, -877 und -1011). Abgesehen von H-Brücken der Wassermoleküle untereinander, bildet zudem Wat871 zu His392 zwei H-Brücken. Keins der drei Moleküle ist auch nur annähernd in einer Position, um als Akzeptor für die Hydrolyse von Sac zu fungieren. Des Weiteren zeigten sich teilweise Interferenzen zwischen Glc-Resten der Maltoheptaose und nicht ausgetauschten, aber repositionierten AAn bei den Varianten V16, V19 und V28. Neben der Interferenz mit dem Glc-Rest in *subsite* +2 ergaben sich im Fall von V19 und V28 dadurch zusätzliche Interferenzen mit Glc-Resten in weiteren *subsites*.

Ferner ergaben sich für V16 bzw. V17 schwache intramolekulare Überschneidungen zwischen Glu396 und Arg446 bzw. Lys391 und Leu483. Offenbar galten bei den für die Modellierung einerseits und die Berechnung der Interferenzen andererseits verwendeten Programmen bzw. Parametern unterschiedliche Beschränkungen bezüglich der erlaubten räumlichen Überschneidung.

Tab. 48. Räumliche Interferenzen zwischen den modellierten AS-Varianten aus Bank 5H und im Aktiven Zentrum gebundener Maltoheptaose bzw. Wasser

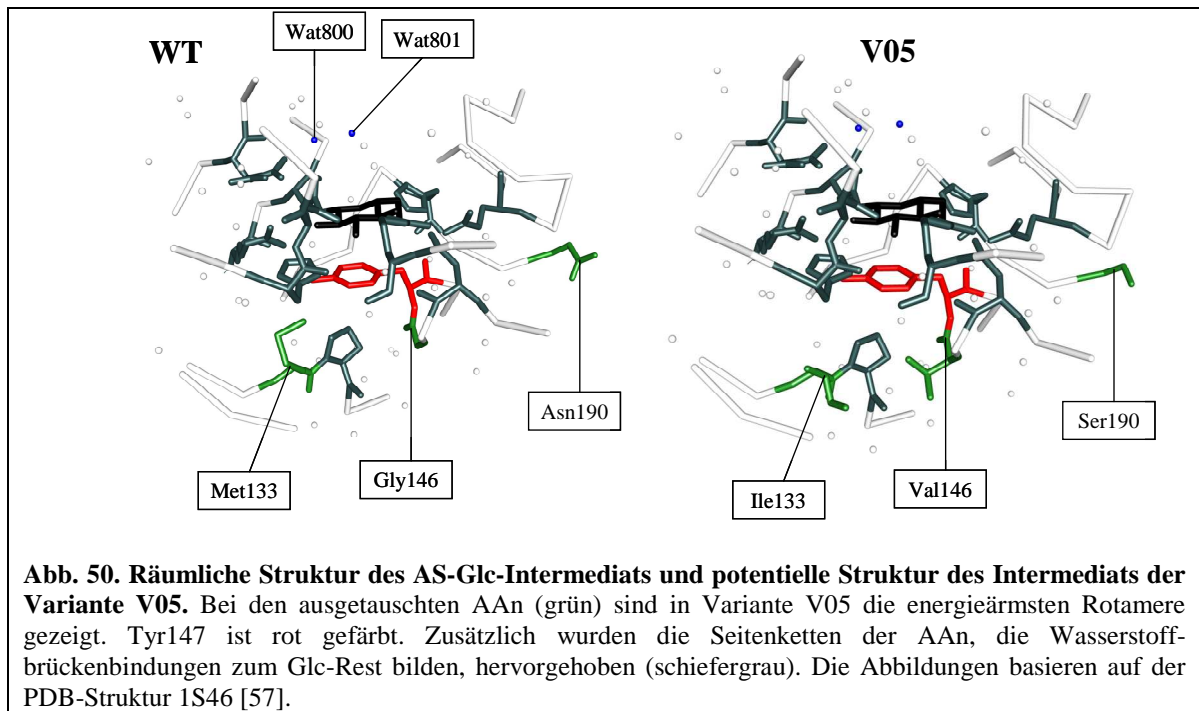
Variante	An der Interferenz beteiligte Moleküle oder Reste		Anzahl der Interferenzen	
	AA ¹⁾	Glc7 oder Wasser ²⁾	für die Reste	für die Variante insgesamt
V16	Arg226	Glc(+2)	4	26
	Cys391	-	-	
	Glu396	Glc(+2)	18	
		Glc(+3)	3	
		Arg446	1	
V17	Lys391	Wat871	1	8
		Wat877	3	
		Wat1011	2	
		Leu483	1	
	Ala396	Glc(+2)	1	
V19	Arg226	Glc(+2)	2	5
	Glu394	-	-	
	Ala396	Glc(+2)	1	
	Arg446	Glc(+2)	1	
	Arg415	Glc(+4)	1	
V20	Asp396	Glc(+2)	3	15
		Glc(+3)	12	
V28	Ala396	Glc(+2)	1	7
	Thr398	Glc(+3)	2	
	Arg415	Glc(+4)	3	
	Arg509	Glc(-1)	1	

¹⁾ Substituierte Reste sind fett hervorgehoben.

²⁾ In Klammern ist die *subsite* angegeben, in dem sich der betreffende Glc-Rest befindet.

Die Eigenschaften der V05 aus Bank 7/1 sind offenbar stärker für die Abreaktion als für die Bildung des AS-Glc-Intermediats verändert. Daher wurde für ihre Darstellung in Abb. 50 von der Struktur des Intermediats ausgegangen. Mit Hilfe des Programms „UCSF Chimera“ Version 1, Build 2470 [69] wurden die WT-AA_n in den Positionen 133, 146 und 190 durch das energetisch günstigste Rotamer der jeweiligen neu eingeführten AA ersetzt. Das V05-Glc-Intermediat wird sehr langsam hydrolysiert, daher ist die Lage der potentiell hydrolysierenden Moleküle Wat800 und Wat801 in Abb. 50 ebenfalls hervorgehoben [57]. Aufgrund der Distanz zum Aktiven Zentrum ist es klar, dass die substituierten AA_n nicht direkt mit dem Substrat wechselwirken. Räumliche Überschneidungen ergaben sich zwischen Ile133 und Tyr104 bzw. zwischen Val146 und Pro134.

Sich durch die Struktur fortpflanzende Effekte sind offenbar für die Eigenschaften der Variante V05 verantwortlich. Da diese nur sehr unzulänglich berechenbar sind, erfolgte keine Modellierung der Struktur wie für die Varianten der Bank 5H. Möglicherweise beeinflusst hauptsächlich das relativ zu Gly größere Val146 die Position von Tyr147 und damit die Lage des auf dem Tyr aufliegenden Glc-Restes.



Wegen der relativ großen Übereinstimmung der katalytischen Eigenschaften der Variante V07 zu WT-AS wurde auf eine Darstellung der räumlichen Struktur mit Position der ausgetauschten AAn verzichtet.

4. DISKUSSION

4.1. Expression und Reinigung von AS

Die Klonierung und Expression des AS-Gens aus *N. polysaccharea* wurde wie beschrieben bereits von Potocki de Montalk *et al.* durchgeführt [25]. Das dort benutzte Expressionssystem mit dem Vektor pGEX-6-P-3 in einem *E.-coli*-Stamm zeigte jedoch eine vergleichsweise schlechte Biosynthese der AS. Deshalb wurde in dieser Arbeit das Gen für AS wurde in den Vektor pET33b(+) integriert, da dieser bereits mit sehr guten Ausbeuten in voran gegangenen Arbeiten mit der Glucansucrase GtfR aus *S. oralis* verwendet worden war [70]. Zusätzlich wurde der Vektor pQE-81L zur Klonierung genutzt, da dessen T5-Promotor, anders als beim Vektor pET33b(+), von der *E.-coli*-eigenen RNA-Polymerase erkannt wird (siehe Kapitel 3.1.1.3). Dies ermöglicht die Nutzung hocheffizient transformierbarer Wirtsstämme, wie sie zur Erzeugung großer Variantenbanken nötig sind. Ein anderer wesentlicher Aspekt war, dass beide Vektoren (5'-terminal) für ein His₆-Segment codieren, so dass sich das Genprodukt in einfacher Weise über eine Affinitäts-Chromatographie reinigen lassen sollte.

Als Wirtstamm für pET33b(+)-Konstrukte wurde *E. coli* BL21*(DE3) verwendet, da dieser über ein T7-RNA-Polymerase-Gen verfügt (siehe Kapitel 3.1.1.1). Die T7-RNA-Polymerase kann die in diesem Vektor hinter den späten T7-Promotor klonierten Gene mit hoher Effizienz transkribieren. In der Literatur werden einige Nachteile bei einer Hochexpression von Genen genannt. Große Mengen von mRNA können beispielsweise zu Ribosomenschädigung und Zelltod, eine nicht stringent regulierte T7-RNA-Polymerase-Synthese kann zu Instabilität der Expression und des Plasmids führen [85]. Bei der Hochexpression kann es zudem zu fehlerhaften Faltungen und zum proteolytischen Abbau der Proteine kommen oder diese verbinden sich miteinander zu unlöslichen Aggregaten („Inclusion bodies“) und fallen aus [86,87]. In den von mir konstruierten Systemen traten derlei Probleme nicht oder nicht wesentlich auf, wobei mit der Absenkung der Inkubationstemperatur von 37°C auf 30°C von vornherein eine einfache Strategie zur Verringerung der Bildung von „Inclusion bodies“ angewendet wurde [87]. Bei verringerter Temperatur bleibt Proteinen mehr Zeit, in ihre native Konformation überzugehen.

Die erzielten Ausbeuten an gelöstem Genprodukt aus Zellextrakt von BL21*[DE3] (pJEA1000) betrugen ca. 88 mg Enzym pro Liter bei einer OD₆₀₀ von 4. Das entspricht etwa 1120 U/l AS. Potocki de Montalk *et al.* [25] beschreiben die Hochexpression eines GST-AS-Fusionsprotein-Gens im Vektor pGEX-6-P-3 mit *E. coli* BL21 als Wirt. Der Zellextrakt enthielt nach Angaben der Autoren bei gleicher optischer Dichte etwa 400 U/l GST-AS-Fusionsprotein. Allerdings vermittelt der optische Eindruck des AS-Anteils am Gesamtprotein (per SDS-PAGE) ein weitaus schlechteres Ergebnis.

Leicht andere Reaktionsbedingungen im Aktivitätstest (pH-Wert etwas näher am Optimum für AS) sowie die etwas unspezifischere Nachweismethode des Sac-Umsatzes (reduzierende Zucker statt freie Fru) bei Potocki de Montalk führten eventuell zu den erhöhten Aktivitätswerten im Zellextrakt [25]. Dies würde den Widerspruch zum optischen Eindruck zumindest ansatzweise erklären. Im Gegensatz dazu lag die spezifische Aktivität der gereinigten AS bei den genannten Autoren allerdings unter dem von mir ermittelten Wert. Aus den vorhandenen Daten wurde abgeschätzt, dass die Ausbeute im hier beschriebenen System ca. 4-mal höher ist als bei Potocki de Montalk [25]. In Anbetracht des augenscheinlich weitaus höheren AS-Anteils am Gesamtprotein (per SDS-PAGE) erscheint ein noch größerer Faktor realistisch.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus [25] wurde keine Sekretion von AS ins Kulturmedium nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Wie beschrieben konnte die His-markierte AS durch einen einzigen Chromatographie-Schritt effizient gereinigt werden. Damit stellen die hier konstruierten Expressions- und Reinigungssysteme die bisher effektivsten für AS dar.

4.2. Charakteristika von WT-AS

Mögliche Donor-Substratanaloga für AS lassen sich unterteilen in Substrate, die einerseits im Glc-Teil und andererseits im Fru-Teil eine Modifikation im Vergleich zu Sac aufweisen. Der Umsatz von Donor-Substraten, die im Fructoseteil abweichen, ist beispielsweise für Maltooligosaccharide [42,44] oder α -D-Glucopyranosyl-Fluorid [88] beschrieben worden. Der Ersatz von Fru durch Fluor zeigt, dass selbst extreme Änderungen im Fructoseteil (in *subsite* +1) des Substrats Sac toleriert werden. Analysen des Komplexes der inaktiven Variante Glu328Gln zeigten, dass die Sac-Bindung in erster Linie durch Interaktionen des Enzyms mit dem Glc-Ring erfolgt [35].

Da nur im potentiell transferierten (Glc-)Teil enthaltene Änderungen zu neuartig glycosylierten Produkten führen können, wurden die Untersuchungen dieser Arbeit mit diesem Typ von Donor-Analoga durchgeführt. Untersucht wurde hauptsächlich die Reaktion von WT-AS mit dem Sac-Analogen Allosac. Dieses unterscheidet sich vom natürlichen Substrat Sac lediglich durch eine geänderte Konfiguration am C3-Atom im Glc-Teil (siehe Abb. 23).

Für die produktive Bindung von Allosac im Aktiven Zentrum von WT-AS (siehe 3.2.1) wurde bei der *in silico*-Analyse, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Analoga, keine sterische Hinderung prognostiziert. Im Gegensatz zu Galacto- und Mannosac deutet hier die in ihrer Stellung geänderte Hydroxylgruppe vom aromatischen Ring des Tyr147, das eine Plattform für den Glc-Ring darstellt, fort. Tatsächlich konnte sowohl im Zellextrakt als auch mit der gereinigten WT-AS die langsame Freisetzung von Fru gemessen werden (siehe Abb. 24 und Abb. 25). Ein Umsatz des Sac-Analogons Allosac durch WT-AS scheint daher vorzuliegen. Die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit lag dabei allerdings etwa 360fach niedriger als mit dem Substrat Sac.

Eine reduzierte Aktivität ist durchaus zu erwarten, da davon auszugehen ist, dass die strukturelle Ausbildung des Aktiven Zentrums auf die Nutzung der Sac evolviert wurde. Neun direkte und eine Wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindung tragen zur korrekten Ausrichtung und Stabilisierung des Glc-Restes der Sac im Aktiven Zentrum bei [35]. Durch die geänderte Stellung der OH-Gruppe am C3-Atom im Allosylrest fällt die H-Brücke zu His392 bei der Bindung von Allosac weg. Ähnliches gilt für das glycosylierte AS-Intermediat. Hier sorgen zehn direkte und drei Wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen für die Positionierung der Glc im Aktiven Zentrum [57]. Bei All entfallen hier die H-Brücken von der OH-Gruppe am C3-Atom zu His392 sowie zu Wat823. Man kann also vermuten, dass die Bindung von Allosac im Aktiven Zentrum weniger fest und nicht in der wie für Sac optimalen produktiven Ausrichtung erfolgt. Dadurch würde die Bildung wie die Abreaktion des AS-All-Intermediats verlangsamt.

Aufgrund der geringen Reaktionsgeschwindigkeit und der damit verbundenen geringen Produktbildung kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob eine *de novo*-Synthese von Oligo- oder Polysacchariden aus Allosac bzw. All oder aber die Bildung von Allosac-Isomeren durchgeführt wurde. AS katalysiert mit Sac bei niedrigen Konzentrationen vorwiegend die Substrat-Hydrolyse [41]. Ein ähnlicher Effekt könnte daher auch bei den getesteten Allosac-Konzentrationen gegolten haben, so dass nur All und Fru als Produkte entstanden. Ebenso denkbar ist, dass aufgrund der langsamen

Reaktionsgeschwindigkeit die Konzentration potentieller transallosylierter Produkte unterhalb der Nachweisgrenze der DC lag.

Mit Arbutin, einem ausgezeichneten Akzeptor für die Glucosylierung (siehe 3.1.3.3.1), konnte gezeigt werden, dass AS immerhin auch in der Lage ist, den All-Rest zu transferieren.

Tao *et al.* konnten mit AS aus *N. perflava* (in Form von teilgereinigtem Zellextrakt) dagegen keine Nutzung von Allosac feststellen [89]. Da die AA-Sequenz der AS aus *N. perflava* nicht bekannt ist, kann über die Ähnlichkeit zur AS aus *N. polysaccharea* nichts gesagt werden.

Der zeitliche Verlauf der Fru-Bildung bei Inkubation von Allosac mit AS (siehe Abb. 24) war über die sieben Tage annähernd linear. Das deutet auf eine höhere Stabilität der AS hin als bisher in der Literatur beschrieben. Potocki de Montalk *et al.* [41] geben eine Halbwertszeit ihrer AS-Präparation von nur 21 h bei 30°C an. Die Ursachen für diese Diskrepanz könnten z. B. in abweichenden Reaktionspuffern, Enzympräparationen oder den N-terminalen AA-Sequenzen der beiden ASn liegen. Eine genauere Untersuchung war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Für die Substrat-Analoga Galacto-, Manno- und Xylosac wurde unter den gewählten Reaktionsbedingungen kein Umsatz festgestellt. Für die Messung auch geringer Umsätze mit diesen drei Analoga wäre jedoch eine größere als die zur Verfügung gestellte Menge mit höherer Reinheit vonnöten, beispielsweise für die enzymatische Fru-Konzentrationsbestimmung (siehe 2.8.2).

Das negative Ergebnis für Galactosac stimmt mit der *in-silico*-Analyse überein, bei der eine sterische Hinderung mit dem Enzym durch die geänderte Stellung der OH-Gruppe am C4-Atom des Glc-Restes prognostiziert worden war. Feingold *et al.* untersuchten den Umsatz von Galactosac mit einer AS aus *Neisseria perflava* (in Form von ungereinigtem Zellextrakt) [90]. Die Reaktion verlief ähnlich schnell wie mit Sac als Donor-Substrat. Neben der Hydrolyse von Galactosac wurde in geringerem Umfang auch die Bildung eines unbekannten Trisaccharids beobachtet.

Ein Vergleich mit den eigenen erzielten Ergebnissen ist nur sehr eingeschränkt möglich. Zum einen ist, wie bereits beschrieben, die AA-Sequenz der AS aus *N. perflava* nicht bekannt. Zum anderen verwendeten Feingold *et al.* ungereinigten Zellextrakt für ihre Untersuchungen. Das von AS aus *N. polysaccharea* nur schlecht nutzbare Donor-Substrat Maltose wurde durch unbekannte Enzyme in diesem Extrakt unter Bildung großer Mengen eines nicht identifizierten Trisaccharids fünfmal schneller abgebaut als Sac. Folglich lässt sich der Umsatz von Galactosac nicht eindeutig AS zuordnen.

Auch für Mannosac war mittels der *in-silico*-Analyse eine sterische Hinderung prognostiziert worden. In der Literatur wurden keine Daten von AS oder verwandten Enzymen (Familie GH13) mit diesem Substrat gefunden.

Da Xylosac zum Zeitpunkt der *in-silico*-Analyse nicht Teil der Versuchsplanung war, fehlen die Vorhersagen für dieses Substrat. Abgesehen vom fehlenden C6-Atom liegt kein Unterschied zu Sac vor. Bei gleicher Ausrichtung im Aktiven Zentrum dürften räumliche Hinderungen nicht vorliegen. Der Grund für den ausbleibenden Umsatz liegt deshalb möglicherweise beim Verlust einer Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen, die für die korrekte Positionierung des Substrats im Aktiven Zentrum notwendig sind. Das AS-Xyl-Intermediat wird möglicherweise nicht gebildet, da die H-Brücken zur Hydroxylgruppe am C6-Atom des Glycosyl-Donors (bei Sac) fortfallen. Unter anderem betrifft dies die Bindung zu Asp286, das den primären nucleophilen Angriff startet. Literaturrecherchen ergaben lediglich, dass Avigad *et al.* mit der von ihnen hergestellten Xylosac weder die Nutzung als Donor-Substrat noch als Akzeptor mit Amylosucrase (aus *N. perflava* feststellten [91].

Über den Umsatz von im Glc-Teil geänderten Donor-Substraten durch AS aus *N. polysaccharea* ist bislang nichts beschrieben worden.

Für andere Glucansucrasen wurde vorwiegend die inhibierende Wirkung solcher Substrate beschrieben. Diese unterschieden sich allerdings teilweise stärker von Sac, als in der vorliegenden Arbeit [92,93]. Binder und Robyt testeten beispielsweise GTF-I und GTF-S aus *Streptococcus mutans* 6715 unter anderem mit Sac-Analoga, deren Hydroxylgruppe am C3 bzw. C6 entfernt bzw. durch ein oder zwei Fluor- oder Sulfhydrylreste substituiert worden waren, auf Inhibition bzw. auf Substrat-Nutzung [94,95]. Abhängig vom angebotenen Substrat und je nach Enzym konnten sie verschiedene Formen der Kompetition sowie die Übertragung des Glc-Äquivalents (Akzeptor-Reaktion) für 3-Desoxysaccharose, 3-Desoxy-3-Fluorsaccharose und 6-Thio-saccharose (in letzterem Fall *de-novo*-Polymerbildung durch GTF-I) feststellen. Allosac fungierte bei beiden Enzymen nicht als Glycosyl-Donor [95].

Als sehr effizienter neuer Akzeptoren für AS wurde in dieser Arbeit Arbutin gefunden. Dieser Akzeptor steigerte mit Sac als Donor-Substrat die Reaktionsgeschwindigkeit von AS immens.

In vergleichbarer Weise glucosylierte AS aus *Deinococcus geothermalis* mit Sac als Donor Arbutin mit hoher Ausbeute [78]. Anders als bei den eigenen Ergebnissen mit AS aus *N. polysaccharea* (siehe Kapitel 3.1.3.3.2) wurde von den Autoren jedoch nur die Übertragung eines einzigen Glc-Restes (in α -1,4-Stellung mit Arbutin verknüpft) nachgewiesen. Dieser Unterschied in der Limitierung der Transferreaktion dürfte auf Sequenz-Unterschiede zwischen AS und DGAS und die damit verbundenen strukturellen Abweichungen zurückzuführen sein. Das Enzym aus *D. geothermalis* weist nämlich nur 42% AA-Sequenz-Identität mit AS aus *N. polysaccharea* auf [33]. Moon et al. fanden bei Untersuchungen mit einer Glucansucrase aus *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB dagegen ein ähnliches Verhältnis von Arb-G1 und Arb-G2 wie bei AS aus *N. polysaccharea* [77], jedoch mit α -1,6-Verknüpfung der Glc-Reste. In analoger Weise übertrug CGTase aus *Bacillus macerans* ein- bzw. zwei Glc-Reste (α -1,4-verknüpft) auf Arbutin [96].

4.3. Charakteristika von Tyr147-Varianten

Tyr147 bildet ein wichtiges strukturelles Element in der Ausbildung des Bodens der Substrattasche im Aktiven Zentrum, indem es eine hydrophobe Plattform für den Glc-Rest des Substrats liefert. Stapelkräfte der aromatischen Ringstruktur des Tyrosins (so genannte „*stacking interaction*“) tragen zur Bindung und korrekten Positionierung des Glc-Restes im Aktiven Zentrum bei (1JGI, [35]). Ebenso, wenn auch weniger stark, wechselwirkt Phe250 auf der anderen Seite hauptsächlich mit C6 [57]. Der Tyr147-Rest ruht auf Pro134, strukturell konserviert in der eng verwandten TAKA-Amylase und der Oligo-1,6-Glucosidase. Weiterhin wird Tyr147 durch eine H-Brücke zu Asp182 stabilisiert [35].

In den bislang bekannten AS liegen entweder Tyr- oder seltener Phe-Reste an dieser Position vor [57]. Die starke Konservierung dieser AA stimmt mit ihrer wichtigen Rolle im Aktiven Zentrum überein. Der Austausch dieser Seitenkette führte also nicht unerwartet zu einer deutlichen Verringerung der Aktivität von AS. Die AA wurde ausgetauscht, weil *in-silico*-Analysen ergeben hatten, dass nur Tyr147 eine sterische Interferenz mit den Sac-Analoga Galacto- und Mannosac zeigte.

Die Variante Phe147 besaß mit 79 % der spezifischen Aktivität des WT die mit Abstand höchste verbleibende Aktivität aller acht erzeugten Varianten. Auch ohne die Hydroxylgruppe blieb die Funktion der Seitenkette allein durch den aromatischen Ring offenbar weitgehend erhalten. Albenne et al. nahmen jedoch an, dass die kurze H-Brücke von His392 zur Hydroxylgruppe des Tyr147 möglicherweise für die korrekte

Positionierung der Plattform entscheidend ist [97]. Meine Ergebnisse zeigten, dass die OH-Gruppe nicht essentiell ist. Die Ausrichtung des energetisch günstigsten Rotamers von Phe147 (1JGI, [35]) unterschied sich, nach Berechnung mit „Chimera“ [69] (Dunbrack Rotamer-Bibliothek [98]), durch eine Drehung des aromatischen Rings von 15-20° aus der Ringebene des Tyr147. Diese Verschiebung trägt sehr wahrscheinlich zum Absinken der Aktivität bei.

Wie Tab. 27 zeigt, lagen die übrigen sieben AA147-Varianten mit 5 % bis unter 1 % der Aktivität des WT alle deutlich unter den Werten der Phe147-Variante. Über die Gründe für die unterschiedlichen Aktivitätsabnahmen dieser Varianten kann ohne Röntgenstrukturanalysen nur spekuliert werden.

Die größte strukturelle Ähnlichkeit zum WT wies nach Phe die AA His durch ihren (etwas kleineren) aromatischen Ring auf. Die Berechnung zeigte eine vergleichbare Lage des Rings des energetisch günstigsten Rotamers wie bei Phe mit einer etwas stärkeren Verdrehung aus der Ringebene von 25-30° gegenüber Tyr147. Sowohl Phe147 als auch His147 bewegen sich 1,0-1,5 Å in Richtung des Glc-Restes des Substrats. Dennoch lag die katalytische Aktivität von His147 schon ca. 20-fach unter der des WT und noch etwa 15-fach unter der der Phe-Variante. Möglicherweise verursachte hier auch die Ladung dieses aromatischen Ringes eine deutlich schlechtere produktive Ausrichtung der Glc im Aktiven Zentrum. Die beiden Stickstoff-Atome könnten als Donor bzw. Akzeptor für H-Brücken wirken, bilden bei Berechnung mit „Chimera“ jedoch keine H-Brücken zur Glc.

Die Annahme, dass der aromatische Ring der His147-Variante kaum noch Plattform-Funktion ausübt, wird unterstützt von der Tatsache, dass die ringlose kurze hydrophobe Seitenkette von Ala147 zu einer ähnlich hohen spezifischen Aktivität führte. Eine weitere Verringerung der spezifischen Aktivität der übrigen Varianten könnte ihre Ursache in zusätzlich auftretenden Interferenzen mit AAn des Aktiven Zentrums haben.

Jeweils etwa noch knapp halb so aktiv wie His147 und Ala147 waren die beiden einander in der Größe ähnlichen Varianten Asn147 und Leu147. Beim unpolaren Leu147 interferierte das energetisch günstigste Rotamer im Modell mit dem C4-Atom der Glc. Für die polare Seitenkette von Asn147 lag nur eine einzige schwache Interferenz zum C4 der Glc für das günstigste Rotamer vor. Eine von diesem Modell divergente Ausrichtung der Seitenkette könnte hier für Interferenzen und den damit verbundenen Aktivitätsverlust verantwortlich gewesen sein. Die dritte, den beiden strukturell ähnliche Seitenkette der Variante Asp147 hatte interessanterweise nur rund ein Fünftel der Aktivität von Asn147 und Leu147. Gravierende sterische Abweichungen der möglichen Rotamere zur ansonsten sehr ähnlichen Seitenkette von Asn147 waren kaum auszumachen. Allerdings unterschieden sich die Bindungspartner der H-Brücken der beiden modellierten Seitenketten. Während diese bei Asn147 zum Asp144 ausgebildet wurden, waren bei Asp147 immer der Glc-Rest (und teilweise Wassermoleküle) involviert. Dadurch könnte die produktive Ausrichtung des Substrats bei Letzterer weiter verschlechtert worden sein.

Aktivitätstests mit den Varianten Ala147, Asn147 und Phe147 in Form von Zellextrakt wurden bei Albenne et al. mit ähnlichen Resultaten durchgeführt [97] und bestätigen daher im Wesentlichen die vorliegenden Ergebnisse. Mit 11 %, 7 % und 67 % verbleibender Restaktivität relativ zum WT sind diese Werte ähnlich hoch wie die in dieser Arbeit ermittelten.

Die beiden einzigen energetisch sinnvollen Rotamere der polaren AAn Ser147 und Thr147 zeigten eine geringe Interferenz mit Asp144. Das in den bis dato bekannten Amylosucrasen invariante Asp144 bildet mit Arg509 eine für die taschenförmige Topologie des Aktiven Zentrums wichtige Salzbrücke. Ferner leistet Asp144 durch mehrere H-Brücken zum Glc-Rest einen wichtigen Beitrag zur Positionierung der Sac [35]. Eine Verschiebung dieser AA aus seiner ursprünglichen Position dürfte sich also

sehr wahrscheinlich stark negativ auf die Aktivität auswirken. Der Austausch Asp144Ala führte bei Albenne et al. zu einer annähernd inaktiven Variante [97].

Die potentielle sterische Hinderung der Substrate Galacto- und Mannosac durch Tyr147 sollte durch den Austausch dieser AA bei einigen Varianten aufgehoben werden. Möglicherweise gelang dies, wurde jedoch durch den starken Rückgang an katalytischer Aktivität überkompensiert.

4.4. Herstellung und Screening semi-statistischer Variantenbanken

4.4.1. Screening auf veränderte Donor-Substratspezifität

Ein Teilziel der Arbeit bestand in der Herstellung und Suche nach AS-Varianten, die die Übertragung anderer Zucker als Glc ermöglichen würden. Von den entsprechenden Sac-Analoga stand allein Allosac in ausreichender Menge und Reinheit für ein Screening aller Klone zur Verfügung. Wie in Kapitel 3.1.3.4 beschrieben, konnte unerwarteterweise bereits für den WT eine geringe Transfer-Aktivität für Allosac festgestellt werden. Vor diesem Hintergrund wird das Screening nach AS-Varianten mit erhöhter Aktivität diskutiert.

Zwar deutete das Screening bei einer Vielzahl von Klonen auf einen höheren Allosac-Umsatz als beim WT hin. Jedoch konnte dies bei der Überprüfung ausgewählter Varianten (vergl. Kapitel 3.3.3.3) nicht bestätigt werden. Das Screening lieferte also definitiv falsch-positive und möglicherweise falsch-negative Ergebnisse. Wahrscheinlich war die Reproduzierbarkeit im Screening zu gering.

Die Differenz der normierten Messwerte zwischen den positiven und negativen Kontrollansätzen (AS-WT und *E.-coli*-Wirtsproteine) war bei den Banken 5H, 6H, 9H und 7/1/9 vergleichbar hoch (vergl. Tab. 32). Die Werte bei den Banken 5/6 und 7/1 waren dagegen etwa doppelt so hoch. Die absolute Abs bei 340 nm lag bei letzteren sogar 4-fach (AS-WT) bzw. 9-fach (*E.-coli*-Wirtsproteine) über den Werten der übrigen Banken.

WT und Wirt waren gleichartig in mehreren Parallelen als Glycerinkulturen hergestellt worden, diese wurden jeweils für alle Banken verwendet. Obwohl mit größter Sorgfalt auf die Einhaltung konstanter Bedingungen geachtet wurde, dürften die Absorptions-Unterschiede bei der Aktivitätsmessung letztlich durch abweichende Kultivierungs- und/oder Lysebedingungen, bzw. durch abweichende Zusammensetzungen des Allosac-enthaltenden Mastermixes oder der Enzymlösungen für die Glc/Fru-Messungen zu erklären sein (vergleiche Kapitel 2.8.5). Ausschlaggebend für diese Annahme ist die Tatsache, dass genau diese beiden Banken für das Screening gemeinsam präpariert und an einem Tag getestet worden waren. Ein wiederholtes Screening konnte mangels ausreichender Allosac-Menge nicht durchgeführt werden. Die genauere Eingrenzung der Ursachen fällt daher schwer.

Grundsätzlich konnte die WT-Aktivität gegenüber Allosac, obwohl gering, ausreichend klar vom Hintergrund unterschieden werden. Zu Fehlern führte möglicherweise der häufig schon hohe Absorptionswert bei 340 nm bei der Hintergrund-Messung. Dieser resultierte vermutlich unter anderem aus dem hohen Zellextrakt-Anteil im Reaktionsansatz. Anders als beim Screening auf Sac-Aktivität war hier, wegen der geringen erwarteten Aktivität, ein verhältnismäßig hoher Anteil Zellextrakt gewählt worden. Im Verhältnis zum hohen Hintergrund-Wert war die Absorptionszunahme bei der Fru-Messung des AS-WT relativ gering. Da lediglich eine Endpunkt-Messung vorgenommen wurde, konnte zudem der Verlauf der Fru-Bildung nicht dokumentiert werden. Geht man von gleicher Zusammensetzung der *E.-coli*-Wirtsproteine bei WT und

Wirt aus, liegt der einzige Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle in der Expression des AS-Gens. Die optische Dichte der Bakteriensuspensionen von WT und Wirt vor der Lyse war im Durchschnitt immer vergleichbar hoch, mit leicht höheren Werten beim Wirt. Die höheren Fru-Konzentrationen beim WT scheinen daher recht sicher das Ergebnis einer aktiven Fru-Freisetzung durch AS zu sein.

Ebenso unklar ist der Umstand, warum von den ausgewählten Klonen offensichtlich nur die Hälfte ein AS-Gen enthielt bzw. effektiv exprimieren konnte. Beispielsweise besaß im Allosac-Screening keiner der drei getesteten Klone aus Bank 5H eine AS-Bande, die 15 im Sac-Screening derselben Bank ausgewählten Varianten dagegen alle (vergleiche Kapitel 3.3.4.1). Alle anderen Banken zeigten vergleichbare Resultate (Daten nicht gezeigt). Beide Screenings wurden mit denselben Zellextrakten durchgeführt. Fehlendes Antibiotikum könnte bei der Anzucht der Klone für die Screenings zum Plasmidverlust führen. Beim zeitgleich stattfindenden Screening auf Elongationsdefizienz konnte für wenigstens zwei der oben beschriebenen Allosac-Varianten ohne AS-Bande aber eine Sac-Aktivität nachgewiesen werden. Dies lässt auf nicht nachvollziehbare Verfahrensfehlern zum Zeitpunkt der Überprüfung der ausgewählten Varianten schließen.

Durch Modifikation bei der Inkubation lassen sich vielleicht noch höhere Zelldichten und eine verbesserte Expression und damit erhöhte AS-Konzentrationen erreichen. Dies und insbesondere eine höhere Allosac-Konzentration führen zu größerer Aktivität und damit einem deutlicheren Absorptionsanstieg, wodurch die Sensitivität dieses Screenings weiter verbessert werden könnte.

Es sind keine weiteren Arbeiten bekannt, in denen AS-Varianten erzeugt werden sollten, die die Fähigkeit besitzen, auch andere Zuckerreste als Glc übertragen zu können.

4.4.2. Screening auf Defizienz in der Elongation

Beim Einsatz von AS als Katalysator zur regio- und stereospezifischen Glycosylierung von Akzeptor-Molekülen ist eine unlimitierte Elongation der Glc-Kette in der Regel nicht erwünscht. Daher sollten Varianten erzeugt werden, die unter Beibehaltung der Tra-Aktivität und möglichst ohne Steigerung der Hydrolyse-Rate eine Limitierung des Kettenwachstums aufweisen.

Die angewandte Methode zum Screening auf Defizienz in der Elongation lieferte für Bank 5H sehr zuverlässige Ergebnisse, während bei Bank 7/1 nur Falsch-Positive gefunden wurden. Die Ergebnisse der Standard-Messung der Sac-Aktivitäten relativ zum WT bei den ausgewählten Varianten von Bank 5H stimmten vergleichsweise gut (Ausnahme V17) mit den Werten im Screening überein. Im Gegensatz dazu lagen die Aktivitäten im Standard-Test bei über 70 % der ausgewählten Varianten der Bank 7/1 höher als beim Screening. Denkbar wäre, dass diese Varianten eine geringere Affinität zu Sac aufweisen als der WT. Während die Verdreifachung der Sac-Konzentration zwischen Screening und Standard-Test bei den Enzymvarianten unter diesen Umständen zu einer starken und eher linearen Aktivitätszunahme führte, fiel die Steigerung beim WT durch die größere Nähe zum Bereich der Substratsättigung verhältnismäßig geringer aus. Die Bestimmung der K_m -Werte der Varianten wäre für eine Bestätigung dieser Hypothese hilfreich.

Ferner wurde bei den ausgewählten Varianten der Bank 5H auch in einer ÜN-Reaktion ausnahmslos kein Produkt mit mehr als drei Glc-Einheiten gebildet. Demgegenüber bestätigte sich die Defizienz in der Glucanbildung bei den selektionierten Varianten der Bank 7/1 jedoch nicht. Während im auf 45 min Reaktionsdauer ausgelegten Hochdurchsatz-Verfahren mit Glycogen bei den ausgewählten Varianten dieser Bank keine Iodfärbung festgestellt wurde, konnte für eine ÜN-Reaktion ohne Glycogen sowohl im DC als auch durch Färbung mit Iodlösung eine Amylosebildung festgestellt werden.

Nimmt man die durchschnittliche Absorption der WT-Kontrollen bei 570 nm von 1,6 im Screening als Vergleich (Abs_{570} der Wirtskontrolle durchschnittlich 0,1), so hätte bei den Varianten der Bank 7/1 aufgrund der relativ hohen Transfer-Aktivität (durchschnittlich ca. 50 % der Tra-Aktivität des WT in Anwesenheit von Glycogen, siehe Tab. 37) zumindest ansatzweise auch unter Screening-Bedingungen die Fähigkeit zur Polymerbildung detektierbar sein sollen. Eine einfache Erklärung wäre, dass die Varianten zunächst nur die Hydrolysereaktion durchgeführt hatten, und erst verzögert die Glucanbildung erfolgte. Allerdings erhöhte die Zugabe von Glycogen bei allen Varianten der Bank 7/1 deutlich die Tra-Aktivität. Glycogen diene demnach als Akzeptor der Glc-Übertragung. Eine initiale Sac-Hydrolyse zur Erzeugung von Startermolekülen [40] war somit offensichtlich nicht notwendig, so dass eine verzögerte Glucanbildung als Grund für die negative Iodfärbung ausgeschlossen werden kann.

Ein Einfluss der AAn der Segmente 7 und 1 auf die Produktlänge konnte anhand der erzielten Ergebnisse also nicht nachgewiesen werden. Ferner ließen sich die abweichenden Ergebnisse zwischen Screening und anschließender Überprüfung nicht ohne weiteres klären. Ein möglicher Hinweis auf diese Diskrepanz ist evtl. die geringere Sac-Aktivität im Screening im Vergleich zum anschließenden Standard-Test. Die Ursachen hierfür liegen anscheinend in den Bedingungen bei Anzucht, Lyse oder Pufferzusammensetzung im Screening, welche auch die Elongationaktivität negativ beeinflusst haben. Eine genaue Eingrenzung war nicht möglich.

Eine Verlängerung der Reaktionsdauer wäre, im Nachhinein betrachtet, sinnvoll gewesen, um den Nachweis der Polymerbildung zu verbessern und damit die Selektion von Varianten ohne Defizienz bei der Elongation möglichst zu vermeiden. Die Gesamtdauer der Screenings hätte sich dadurch jedoch erheblich verlängert. Zudem ist die Stabilität der Enzyme zur Glc/Fru-Bestimmung begrenzt bzw. die von AS im verwendeten TRA-Puffer (vergl. Kapitel 2.8.6) offen.

Glycogen war aus verschiedenen Gründen beim Screening als Akzeptor in die Reaktion eingesetzt worden. Es steigert (bei WT-ähnlicher Nutzung) die Aktivität von AS, indem es als Akzeptor wirkt, sowie möglicherweise durch eine Konformationsänderung von AS [44]. Dies hat den Vorteil, dass ausreichend hohe Absorptionen innerhalb kurzer Reaktionszeiten entstehen und damit ein hoher Proben-Durchsatz erzielt werden kann. Durch die Steigerung der Transfer-Reaktion verschiebt sich zudem die im Screening gemeinsam gemessene Glc/Fru-Konzentration in Richtung eines erhöhten Fru-Anteils. Je weiter dieses Verhältnis zugunsten von Fru verschoben ist, desto besser korreliert die ermittelte Absorption mit dem Sac-Umsatz. Der Nachteil der im Screening durchgeführten kombinierten Glc/Fru-Messung (Varianten mit einem hohen Hyd-Anteil sind scheinbar aktiver als Varianten mit geringem Hyd-Anteil) wird damit größtenteils ausgeglichen. Dies gilt jedoch nicht für Varianten, die Glycogen nicht oder nur vermindert nutzen.

4.5. Charakteristika von semi-statistischen Varianten

4.5.1. Charakteristika von Varianten der Bank 5H

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch eine Strategie der lokal begrenzten statistischen Veränderung in hoher Prozentzahl Varianten erzeugt werden konnten, bei denen die Elongation des natürlichen Akzeptors Glc auf die Übertragung weniger Glc-Reste oder sogar eines einzigen Restes begrenzt war. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die AAn 394 und 396 in der Region 5 maßgeblich die Fähigkeit zur Elongation beeinflussen können. Die Modellierung ausgewählter Varianten diene als Basis für die nachstehende Diskussion der Ergebnisse.

Zufällig gepickte Klone wiesen deutliche Unterschiede in der Gen-Sequenz zu den ausgewählten Klonen auf (siehe Kapitel 3.3.4.4). Eine klare Verringerung von Austauschen in den selektionierten Varianten in den Positionen 390 und 395 deutete darauf hin, dass Änderungen hier entweder vermehrt zur Sac-Inaktivität führten oder die Polymerbildung nicht signifikant beeinflussten.

Die Austauschrate an Position 396 war bei den selektionierten Varianten nicht reduziert. Analog zur Argumentation für Position 390 und 395 verursachte ein Austausch der AA396 die Limitierung der Elongation unter Beibehaltung der Sac-Aktivität. Die fünf näher charakterisierten Varianten tragen Ala (V17, V19, V28), Asp (V20) bzw. Glu (V16) an dieser Position. Bei V20 und V28 müssen die Änderungen der katalytischen Eigenschaften allein aus dem Austausch von AA396 resultieren, da keine weiteren Seitenketten substituiert wurden. Bei V16, V17 und V19 ist jeweils eine weitere AA ausgetauscht. Ser391 ist bei den ersten beiden Varianten ersetzt. V16 enthält einen Cys-Rest an dieser Stelle. Cystein ist die einzige andere natürlicherweise bisher an dieser Stelle gefundene AA. Ser und Cys unterscheiden sich nur durch den Austausch einer Hydroxyl- gegen eine Sulfhydrylgruppe. Es ist daher nahe liegend, dass auch die neuen Eigenschaften von V16 vornehmlich aus der Veränderung an Position 396 resultieren. Lys391 von V17 kann nur durch wenigstens zwei bzw. drei Mutationen eines Ser- bzw. Cys-Codons eingeführt werden. Es ist daher nicht überraschend, dass es bislang noch nicht in WT-Sequenzen gefunden wurde. Die weitgehend, aber nicht völlig übereinstimmenden Eigenschaften von V17 mit V28 zeigen, dass die Ser391Lys-Substitution einen – wenn auch nur kleineren – Einfluss auf das katalytische Verhalten besitzt. V19 trägt den zusätzlichen Austausch Asp394Glu. Diese Variante verhielt sich signifikant anders als V28 mit lediglich dem Gly396Ala-Austausch. Andererseits ähnelte sie in ihrem Verhalten stark V23, V24, V27 und V30, die ebenfalls Asp394Glu-Austausche tragen. Die geänderte katalytische Aktivität all dieser Varianten ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit hauptsächlich auf die Änderung an der Position 394 zurückzuführen.

Die AA-Austausche der fünf näher charakterisierten Varianten wurden modelliert, basierend auf der AS-Kristallstruktur mit im Aktiven Zentrum gebundener Maltoheptaose [36]. Die resultierenden Modelle legen nahe, dass die veränderten Eigenschaften von V16, V17, V20 und V28 ausschließlich oder zumindest in erster Linie das Ergebnis sterischer Interferenzen in *subsite* +2 und/oder +3 zwischen der wachsenden Glc-Kette und den Seitenketten in Position 396 sind.

Die räumlichen Hinderungen sind am größten für V16 mit einem Glu-Rest an dieser Position, sichtbar in Abb. 49. Dies stimmt mit der Unfähigkeit der Variante überein, kein Glc2 als Akzeptor nutzen zu können. Um vom AS-Glc-Intermediat verlängert zu werden, muss der zu glucosylierende Akzeptorteil in *subsite* +1 positioniert werden. Aufgrund der sterischen Behinderung in Position 396 wird die korrekte Positionierung eines Glc-Dimers für eine weitere Elongation offenbar verhindert.

Zu bemerken ist, dass sich im Modell durch die Repositionierung von Arg226 eine Interferenz dieser AA mit der Glc-Einheit in *subsite* +2 zeigte. Die Seitenkette von Arg226, die sich von *subsite* +2 bis +3 bewegen kann, beeinträchtigt unter Umständen durch sterische Hinderung die Bindung von Maltooligosacchariden an der Oligosaccharid-Bindestelle 1 (OBS1) [44]. OBS1 erstreckt sich über das Aktive Zentrum und fünf weitere *subsites* (+2 bis +6) des Zugangskanals [36]. Ein zusätzlicher Einfluss auf die ermittelten Eigenschaften von V16 durch eine Repositionierung von Arg226 ist nicht auszuschließen. Dieser Gesichtspunkt gilt ebenso für V19, die die gleiche Interferenz von Arg226 aufzuweisen scheint.

Die Seitenkette von Asp396 in V20 ist um eine CH₂-Gruppe kürzer als die von Glu396. Diese Variante erlaubt die Synthese von Oligomeren bis zu Glc3, entsprechend einer geringeren Interferenz in *subsite* +2 und mit starker Interferenz in +3.

V17 und V28 besitzen die kleinere AA Ala396. Die Modellierung zeigte geringe Interferenzen mit Akzeptoren in den *subsites* +2 und +3. Die stimmt überein einer ähnlichen Defizienz der Elongation wie bei V20.

Von den sechs Varianten des V19-Typs (siehe 3.3.4.3.1) besitzen fünf einen Glu-Rest an Position 394. Asp394 im WT bildet Wasserstoffbrücken zur wachsenden Glc-Kette in *subsite* +1 und +2 [36]. Die Modellierung der Variante Glu394 legte einen Verlust beider Bindungen nahe, sowie zusätzlich eine Interferenz in Position +2, sodass eine produktive Akzeptor-Bindung von Glc2 höchstwahrscheinlich verhindert wird. Dies stimmt überein mit der Eigenschaft von V19, Glc2 nicht als Donor- und nur sehr schlecht als Akzeptor-Substrat nutzen zu können. Interessanterweise wurde beschrieben, dass auch der Austausch von Asp394 gegen die viel kleinere AA Ala zur vornehmlichen Hydrolyse-Reaktion und zum Anstieg des Glc2-Anteils zu Ungunsten der Polymerbildung führte [44]. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für die AA-Austausche Arg446Ala und Arg415Ala beobachtet. Die drei AAn haben in mehreren *subsites* des Aktiven Zentrums Kontakt zu einem Glc7-Molekül [36].

V21, die sechste Variante des V19-Typs, enthält keine Substitution in Position 394, sondern stattdessen die drei Austausche Arg390Cys, Ile395Tyr und Gly396Ser. Ile395 zeigt im WT von der Glucankette weg, so wie Tyr395 in der Variante. Daher dürfte bei dieser AA keine Interferenz mit dem Glucan auftreten. Allerdings könnte die Ausrichtung der großen Tyr-Seitenkette, im Zusammenspiel mit dem Arg390Cys-Austausch, der nach der Modellierung den Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen mit Asp393 und Gly449 bewirkt, eine Repositionierung des benachbarten Asp394 veranlassen. Der Effekt könnte ähnlich dem des Asp394Glu-Austausches sein, beispielsweise den Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Akzeptor und weniger Raum für dessen günstige Ausrichtung bedeuten. Die Hydrolyse-Reaktion, welche von den Varianten des V19-Typs bevorzugt durchgeführt wird, benötigt den Angriff eines Wassermoleküls am C1 des Enzym-Glc-Intermediats. Wat800 in der Struktur 1S46 gilt als wahrscheinlichster Kandidat für diese Reaktion [57]. Sobald ein Glc-Molekül die *subsite* +1 besetzt, wird dieses Wassermolekül verdrängt. Behindert das repositionierte Asp394 jedoch die Bindung von Glc, ist vermehrt mit Bindung von Wasser und mit einer gesteigerten Hydrolyse zu rechnen.

Glucansucrasen aus der Familie 70 der Glycosid Hydrolasen verknüpfen ebenfalls aus Sac gebildete Glc. Es ist wahrscheinlich, dass sie einen ähnlichen „Double-Displacement“-Mechanismus verwenden [26] und eine äquivalente Struktur des Aktiven Zentrums besitzen [24]. Andererseits sind diese Enzyme viel größer, zeigen wenig Sequenz-Ähnlichkeit und besitzen wahrscheinlich eine andere Struktur der Domänen [26]. Zur B'-Domäne der AS, bestehend aus den AA-Positionen 395-460, scheint es bei den Glucansucrasen in GH70 kein entsprechendes Gegenstück zu geben. Dagegen besitzen auch sie das Pendant zum His392Asp393-Motiv der AS, welches bei den Enzymen des Clans H generell hochkonserviert vorliegt. Das HisAsp-Motif ist ein putativer Stabilisator des Übergangszustands des Intermediats [23,39,82,99]. Interessanterweise wurde gefunden, dass Austausche C-terminal von diesem Motiv ebenfalls die Kettenverlängerung bzw. den Verknüpfungstyp des Polymers beeinflussen [27,100].

Bemerkenswert ist, dass die in AS eingeführten Substitutionen die Transferreaktion nach zwei oder drei Übertragungen unterdrücken, nicht aber die Dissoziation der Reaktionsprodukte und damit die katalytische Aktivität blockieren. Daher scheinen diese Varianten interessante Kandidaten für begrenzte Glucosylierung von Akzeptoren mit Sac als Donor-Substrat zu sein.

4.5.2. Charakteristika der Variante V05 aus Bank 7/1

Die im Abschnitt 3.3 dieser Arbeit beschriebene Variante V05 stammt aus der Bank 7/1 der statistischen Variantenbanken. Sie wurde im Screening unter den gewählten Bedingungen als Tra-aktiv und Polymer-inaktiv selektioniert. Auch wenn die Defizienz in der Kettenverlängerung, wie für alle ausgewählten Vertreter dieser Bank, nicht bestätigt werden konnte, besitzt V05 interessante Eigenschaften, die eine nähere Charakterisierung sinnvoll erscheinen ließen. Anders als der WT ist die Aktivität dieser Variante allem Anschein nach vom Zusatz eines geeigneten Akzeptors für den Glc-Transfer abhängig. Während der WT mit Sac als einzigem Substrat zunächst dessen Hydrolyse katalysiert und die freigesetzte Glc anschließend als Akzeptor nutzt, ist bei V05 diese Reaktion weitgehend unterdrückt.

V05 trägt die AA-Austausche Met133Ile in Region 7 und Gly146Val in Region 1, sowie zusätzlich die ungewollte Substitution Asn190Ser außerhalb der mutagenisierten Gensegmente. Letztere wurde vermutlich durch einen Fehler bei der PCR eingeführt. Ein signifikanter Einfluss der AA-Substitution Asn190Ser auf die enzymatischen Eigenschaften von V05 ist eher unwahrscheinlich. Ein Vergleich von acht AS-Sequenzen per BLAST zeigte keine Konservierung dieser AA-Position. Zudem kann die AA durch ihre räumliche Lage keinen direkten Einfluss auf das Substrat nehmen.

Das BLAST-Ergebnis zeigte ferner neben Methionin (Met133 in AS aus *N. polysaccharea*) ebenso oft auch Leucin an vergleichbarer Position. Tatsächlich wurde bei den vier ermittelten Met133-Austauschen der ausgewählten Varianten (Tab. 39) je zweimal Leu und zweimal das strukturell ähnliche, leicht größere Ile gefunden. Die übrigen drei Varianten mit Substitutionen an dieser Stelle (V01, V07 und V13) zeigten jedoch in keinem Fall mit V05 vergleichbare katalytische Eigenschaften.

Man kann daher vermuten, dass die spezifischen Charakteristika von V05 hauptsächlich durch die Substitution an AA-Position 146 in Region 1 hervorgerufen werden. Die strukturell relativ große Änderung von Gly zu Val könnte eine Repositionierung unter anderem des direkt benachbarten Tyr147 verursachen. Dieses Tyr147 spielt für die enzymatische Aktivität eine kritische Rolle. Der hydrophile Glc-Rest ruht im Aktiven Zentrum auf dem hydrophoben aromatischen Ring. Tyr147 wird seinerseits durch Pro134 in seiner Position stabilisiert [35]. Eine mögliche Repositionierung von Tyr147 durch den Austausch von Gly146 und evtl. auch der dem Pro134 benachbarten AA Ile133 kann zu einer strukturellen Änderung insbesondere in der Substratbindungstasche -1 führen.

Wasser und (substituierte) Monomere (Glc, Fru, α -MeG1, Arbutin) dienen offensichtlich schlechter als Akzeptoren als Di- oder Trimere. Läge eine Veränderung in der *subsite* -1 vor, so sollten alle Akzeptoren gleichermaßen betroffen sein. Die Änderungen liegen jedoch wahrscheinlicher in *subsite* +1, da länger-kettige Zucker durch Wechselwirkungen in den *subsites* +2, +3 etc. dieses Defizit kompensieren können. *Subsite* +1 ist von den Substitutionen noch weiter entfernt als *subsite* -1. Ein sich dorthin fortpflanzender Distanz-Effekt ist nur schwer modellierbar und lässt sich daher nur über die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der Variante aufklären.

Interessant ist diese Variante für Synthesezwecke aufgrund der geringen Bildung allein von Sac abhängiger Nebenprodukte bei der Glucosylierung von Akzeptoren.

4.6. Ausblick

Die AA-Austausche bei den ausgewählten Varianten der Bank 5H führten zur Begrenzung der Elongationsfähigkeit auf wenige Glc-Reste ohne die katalytische Aktivität zu eliminieren. In vielen Fällen lag mehr als ein AA-Austausch pro Enzym vor (siehe Tab. 38). Um die beobachteten Effekte den einzelnen substituierten AAn besser

zuordnen zu können, ist die Erzeugung von Varianten sinnvoll, die jeweils nur in einer einzigen der betroffenen AA-Positionen geändert sind.

Durch Sättigungsmutagenese in den kritischen Positionen kann eine weitere Veränderungen bzw. Verbesserung der enzymatischen Eigenschaften angestrebt werden. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit stellen die beiden Positionen Gly396 und Asp394 dafür die folgerichtigsten Kandidaten dar.

Ferner können Röntgenstrukturanalysen von mit entsprechenden Liganden komplexierten Varianten zu definitiven Aussagen über die Ursache der limitierten Elongationsfähigkeit führen.

Für WT-AS wurde die Übertragung von Glc auf den Akzeptor Arbutin per HPLC- und LC-MS-Analyse nachgewiesen. Der direkte Beweis der Übertragung von Allosylresten (mit Allosac als Substrat) auf Akzeptoren konnte jedoch aufgrund geringer Substratmengen und Produktausbeuten bislang nicht erbracht werden. Auch hier erscheinen weitere Experimente zur Aufklärung der Übertragungsreaktion sinnvoll.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Enzymkatalysierte Synthesen könnten in vielen Fällen durch hohe Spezifität und milde Reaktionsbedingungen günstige Alternativen zur klassischen chemischen Synthese bieten. So zum Beispiel bei der Synthese komplexer Oligosaccharide, für die aufgrund der zahlreichen Verknüpfungsmöglichkeiten der Einzelbausteine eine aufwändige Schutzgruppenchemie notwendig ist, um unerwünschte Verknüpfungen zu vermeiden. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Enzym Amylosucrase katalysiert die Übertragung von Glc-Resten auf typischerweise Zucker enthaltende Akzeptor-Moleküle. Der gezielte Einsatz von Amylosucrase als Biokatalysator wird jedoch durch zwei Eigenschaften deutlich eingeschränkt. Zum einen verhindert die enge Donor-Substratspezifität den Transfer anderer Zucker. Zum anderen führt eine unkontrollierte Elongationsreaktion zu großen Mengen unerwünschter Produkte.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, Amylosucrase-Varianten zu erzeugen, bei denen diese Einschränkungen verringert oder aufgehoben sind.

Für die Untersuchungen des Enzyms wurde zunächst das Amylosucrase-Gen aus *Neisseria polysaccharea* kloniert und ein effektives Expressionssystem zur Herstellung entwickelt. Mit diesem wurden Amylosucrase-Ausbeuten von bis zu 30 % Anteil an den gesamten gelösten zellulären Proteinen erzielt. Gleichzeitig wurde zur Vereinfachung der Aufreinigung ein His-Segment in das Enzym eingeführt. Dadurch konnte die Amylosucrase in einem einzigen Chromatographie-Schritt effizient gereinigt werden. Die hier konstruierten Expressionssysteme stellen die bisher effektivsten für Amylosucrase dar.

Zur Veränderung des Enzyms in Hinblick auf die Nutzung von Manno-, Allo- und Galactosac an Stelle von Sac wurden *in-silico*-Analysen mit Hilfe der Kristallstruktur der Amylosucrase durchgeführt. Sie ergaben, dass im Aktiven Zentrum nur die Sac-Analoga Manno- und Galactosac sterische Interferenzen zeigten. Auf Seiten des Enzyms war hieran nur die AA Tyr147 beteiligt.

Tatsächlich konnte bei Untersuchungen der Donor-Substratspezifität des WT-Enzyms ein – allerdings nur langsamer – Umsatz der Allosac festgestellt werden. Mit Allosac als einzigem Substrat war die Reaktionsgeschwindigkeit ca. 400-fach langsamer als mit Sac. Dabei wurde keine Bildung eines All-Polymers – in Analogie zum Glc-Polymer – beobachtet, sondern lediglich die Hydrolyse des Substrats. Bei Untersuchungen zur Akzeptor-Spezifität wurde gefunden, dass Arbutin (4-Hydroxyphenyl- β -D-glucopyranosid) einen ausgezeichneten Akzeptor darstellt. In Gegenwart von Arbutin fand eine Übertragung des Allosylrestes auf diesen Akzeptor statt.

Zur Erzeugung von Amylosucrase-Varianten zur (besseren) Umsetzung von Sac-Analoga wurde über eine partielle Sättigungsmutagenese Tyr147 durch acht verschiedene Seitenketten ersetzt. Die spezifische Aktivität der erzeugten Varianten differierte sehr stark und lag zwischen 0,1 % und 80 % im Vergleich zum WT. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die AA-Position 147 eine wichtige Rolle für die Aktivität der Amylosucrase spielt, aber nicht zwingend von Tyrosin besetzt sein muss. Allerdings konnte bei keiner der Varianten ein messbarer Umsatz der Sac-Analoga Allo-, Galacto-, Manno- oder Xylosac festgestellt werden.

Als zweiter Ansatz zur Erzeugung von Varianten mit geänderter Donor-Substratspezifität wurden semi-statistische Mutagenesen durchgeführt. Dazu wurden fünf Regionen ausgewählt, die für je vier bis sechs im Aktiven Zentrum oder in seiner unmittelbaren Umgebung liegende AAn codieren. Circa 45.000 der erhaltenen Klone

wurden auf Umsatz von Allosac gescreent, da nur dieses Sac-Analogon in ausreichender Menge zur Verfügung stand. 20 ausgewählte Varianten, welche im Screening gegenüber dem WT eine erhöhte Aktivität aufwiesen, zeigten bei der anschließenden Überprüfung in keinem Fall ein derartiges Resultat. Der Grund für die falsch-positiven Ergebnisse konnte nicht definitiv geklärt werden. Die geringen absoluten Unterschiede in den Messwerten des Screenings erscheinen als Ursache am wahrscheinlichsten.

Dieselben Klonbanken wurden benutzt, um Varianten zu finden, die keine unlimitierte Elongationsreaktion mehr durchführen. Je 15 im Screening positive Varianten der Banken 5H und 7/1 wurden zur Überprüfung ausgewählt.

Bei den Varianten der Bank 7/1 konnte eine Defizienz in der Polymerbildung nicht bestätigt werden. Die Reaktionsbedingungen im Screening waren offensichtlich trotz Anwesenheit des für den WT guten Akzeptors Glycogen nicht für eine ausreichende Sensitivität des Polymernachweises geeignet. Als interessant erwies sich dessen ungeachtet die Variante V05, da sie bei der Transferreaktion eine fast vollständige Akzeptor-Abhängigkeit zeigte. Die weitgehende Unterdrückung der Bildung Akzeptor-unabhängiger und damit unerwünschter Nebenprodukte macht die Variante attraktiv für Synthesezwecke.

Für alle selektierten Varianten der Bank 5H wurden die Screening-Ergebnisse bestätigt. Sie konnten ausnahmslos kein Produkt mit mehr als drei Glc-Einheiten bilden. Am stärksten war die Veränderung bei Variante V16 ausgeprägt, die sogar kein Produkt mit mehr als zwei Glc-Einheiten bildete. Die Ermittlung der ausgetauschten AAn deutete darauf hin, dass hauptsächlich Substitutionen in den Positionen 394 und 396 zur Limitierung der Elongationsfähigkeit beitragen. Die strukturelle Modellierung von fünf Varianten spricht dafür, dass die veränderten Eigenschaften hauptsächlich das Ergebnis sterischer Interferenzen zwischen der wachsenden Glc-Kette und diesen beiden Seitenketten sind, die in den *subsites* +2 und +3 lokalisiert sind.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Cote, G.L. and Tao, B.Y. (1990). Oligosaccharide synthesis by enzymatic transglycosylation. *Glycoconjugate Journal* 7, 145-162.
- [2] Geyer, H. (1998). Strategies for glycoconjugate analysis. *Acta Anatomica* 161, 18-35.
- [3] Dwek, R.A. (1996). Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chemical Reviews* 96, 683-720.
- [4] Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97-130.
- [5] Ohtsubo, K. and Marth, J.D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126, 855-867.
- [6] Lindhorst, T.K. (2000). Struktur und Funktion von Kohlenhydraten. *Chemie in unserer Zeit* 34, 38-52.
- [7] Moynihan, P.J. (1998). Update on the nomenclature of carbohydrates and their dental effects. *Journal of Dentistry* 26, 209-218.
- [8] Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412.
- [9] Teughels, W., van Essche, M., Sliepen, I. and Quirynen, M. (2008). Probiotics and oral healthcare. *Periodontology* 2000 48, 111-147.
- [10] Mehvar, R. (2000). Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *Journal of Controlled Release* 69, 1-25.
- [11] Gruner, S.A.W., Locardi, E., Lohof, E. and Kessler, H. (2002). Carbohydrate-based mimetics in drug design: sugar amino acids and carbohydrate scaffolds. *Chemical Reviews* 102, 491-514.
- [12] Verband der chemischen Industrie e.V. (VCI). <http://www.vci.de>
- [13] Sidebotham, R.L. (1974). Dextran. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 30, 371-444.
- [14] Seymour, F.R. and Knapp, R.D. (1980). Structural analysis of dextrans, from strains of *Leuconostoc* and related genera, that contain 3-O- α -D-glucosylated α -D-glucopyranosyl residues at the branch points, or in consecutive, linear positions. *Carbohydrate Research* 81, 105-129.

- [15] Hare, M.D., Svensson, S. and Walker, G.J. (1978). Characterization of the extracellular, water-insoluble α -D-glucans of oral streptococci by methylation analysis, and by enzymic synthesis and degradation. *Carbohydrate Research* 66, 245-264.
- [16] Monchois, V., Willemot, R.M. and Monsan, P. (1999). Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 131-151.
- [17] Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 280, 309-316.
- [18] Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 293, 781-788.
- [19] Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal* 316 (Pt 2), 695-696.
- [20] Albenne, C., Skov, L.K., Tran, V., Gajhede, M., Monsan, P., Remaud-Siméon, M. and André-Leroux, G. (2007). Towards the molecular understanding of glycogen elongation by amylosucrase. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 66, 118-126.
- [21] Henrissat, B. and Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 7, 637-644.
- [22] Skov, L.K. et al. (2001). Amylosucrase, a glucan-synthesizing enzyme from the α -amylase family. *Journal of Biological Chemistry* 276, 25273-25278.
- [23] MacGregor, E.A., Jespersen, H.M. and Svensson, B. (1996). A circularly permuted α -amylase-type α/β -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Letters* 378, 263-266.
- [24] Swistowska, A.M., Gronert, S., Wittrock, S., Collisi, W., Hecht, H.J. and Hofer, B. (2007). Identification of structural determinants for substrate binding and turnover by glucosyltransferase R supports the permutation hypothesis. *FEBS Letters* 581, 4036-4042.
- [25] Potocki de Montalk, G., Remaud-Siméon, M., Willemot, R.M., Planchot, V. and Monsan, P. (1999). Sequence analysis of the gene encoding amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Bacteriology* 181, 375-381.
- [26] van Hijum, S.A.F.T., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L. and van Geel-Schutten, I.G.H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 157-176.
- [27] Kralj, S., van Geel-Schutten, I.G.H., Faber, E.J., van der Maarel, M. and Dijkhuizen, L. (2005). Rational transformation of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase into a dextransucrase. *Biochemistry* 44, 9206-9216.

- [28] Hehre, E.J. and Hamilton, D.M. (1946). Bacterial synthesis of an amylopectin-like polysaccharide from sucrose. *Journal of Biological Chemistry* 166, 777-778.
- [29] Hehre, E.J. and Hamilton, D.M. (1948). The conversion of sucrose to a polysaccharide of the starch-glycogen class by *Neisseria* from the pharynx. *Journal of Bacteriology* 55, 197-208.
- [30] Büttcher, V., Welsh, T., Willmitzer, L. and Kossmann, J. (1997). Cloning and characterization of the gene for amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: production of a linear α -1,4-glucan. *Journal of Bacteriology* 179, 3324-3330.
- [31] Riou, J.Y., Guibourdenche, M. and Popoff, M.Y. (1983). A new taxon in the genus *Neisseria*. *Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie* 134, 257-267.
- [32] Pizzut-Serin, S., Potocki-Véronèse, G., van der Veen, B.A., Albenne, C., Monsan, P. and Remaud-Siméon, M. (2005). Characterisation of a novel amylosucrase from *Deinococcus radiodurans*. *FEBS Letters* 579, 1405-1410.
- [33] Emond, S., Mondeil, S., Jaziri, K., André, I., Monsan, P., Remaud-Siméon, M. and Potocki-Véronèse, G. (2008). Cloning, purification and characterization of a thermostable amylosucrase from *Deinococcus geothermalis*. *FEMS Microbiology Letters* 285, 25-32.
- [34] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- [35] Mirza, O., Skov, L.K., Remaud-Siméon, M., Potocki de Montalk, G., Albenne, C., Monsan, P. and Gajhede, M. (2001). Crystal structures of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* in complex with D-glucose and the active site mutant Glu328Gln in complex with the natural substrate sucrose. *Biochemistry* 40, 9032-9039.
- [36] Skov, L.K., Mirza, O., Sprogøe, D., Dar, I., Remaud-Siméon, M., Albenne, C., Monsan, P. and Gajhede, M. (2002). Oligosaccharide and sucrose complexes of amylosucrase. Structural implications for the polymerase activity. *Journal of Biological Chemistry* 277, 47741-47747.
- [37] Skov, L.K., Mirza, O., Sprogøe, D., van der Veen, B., Remaud-Siméon, M., Albenne, C., Monsan, P. and Gajhede, M. (2006). Crystal structure of the Glu328Gln mutant of *Neisseria polysaccharea* amylosucrase in complex with sucrose and maltoheptaose. *Biocatalysis and Biotransformation* 24, 99-105.
- [38] Koshland, D.E. (1953). Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews* 28, 416-436.
- [39] Uitdehaag, J.C., Mosi, R., Kalk, K.H., van der Veen, B.A., Dijkhuizen, L., Withers, S.G. and Dijkstra, B.W. (1999). X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nature Structural Biology* 6, 432-436.

- [40] Potocki de Montalk, G., Remaud-Siméon, M., Willemot, R.M. and Monsan, P. (2000). Characterisation of the activator effect of glycogen on amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. FEMS Microbiology Letters 186, 103-108.
- [41] Potocki de Montalk, G., Remaud-Siméon, M., Willemot, R.M., Sarçabal, P., Planchot, V. and Monsan, P. (2000). Amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: novel catalytic properties. FEBS Letters 471, 219-223.
- [42] Albenne, C., Skov, L.K., Mirza, O., Gajhede, M., Potocki-Véronèse, G., Monsan, P. and Remaud-Siméon, M. (2002). Maltooligosaccharide disproportionation reaction: an intrinsic property of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. FEBS Letters 527, 67-70.
- [43] Binder, T.P., Cote, G.L. and Robyt, J.F. (1983). Disproportionation reactions catalyzed by *Leuconostoc* and *Streptococcus* glucansucrases. Carbohydrate Research 124, 275-286.
- [44] Albenne, C. Skov, L.K., Mirza, O., Gajhede, M., Feller, G., D'Amico, S., Andre, G., Potocki-Véronèse, G., van der Veen, B.A., Monsan, P., Remaud-Simeon, M. (2004). Molecular basis of the amylose-like polymer formation catalyzed by *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. Journal of Biological Chemistry 279, 726-734.
- [45] Cedrone, F., Ménez, A. and Quéméneur, E. (2000). Tailoring new enzyme functions by rational redesign. Current Opinion in Structural Biology 10, 405-410.
- [46] Scrutton, N.S., Berry, A. and Perham, R.N. (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. Nature 343, 38-43.
- [47] Albenne, C., van der Veen, B.A., Potocki-Véronèse, G., Joucla, G., Skov, L., Mirza, O., Gajhede, M., Monsan, P., Remaud-Simeon, M. (2003). Rational and combinatorial engineering of the glucan synthesizing enzyme amylosucrase. Biocatalysis and Biotransformation 21, 271-277.
- [48] Leemhuis, H., Rozeboom, H.J., Wilbrink, M., Euverink, G.J., Dijkstra, B.W. and Dijkhuizen, L. (2003). Conversion of cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase by directed evolution: the role of alanine 230 in acceptor subsite +1. Biochemistry 42, 7518-7526.
- [49] Arnold, F.H. (1998). Design by directed evolution. Accounts of Chemical Research 31, 125-131.
- [50] Jäckel, C., Kast, P. and Hilvert, D. (2008) Protein design by directed evolution. Annual Review of Biophysics 37, 153-173.
- [51] Reetz, M.T. (2006) Directed evolution of enantioselective enzymes as catalysts for organic synthesis. In: Advances in Catalysis (Gates, B.C. and Knözinger, H., Hrsg.), Academic Press, London.

- [52] van der Veen, B.A., Skov, L.K., Potocki-Véronèse, G., Gajhede, M., Monsan, P. and Remaud-Siméon, M. (2006). Increased amylosucrase activity and specificity, and identification of regions important for activity, specificity and stability through molecular evolution. *FEBS Journal* 273, 673-681.
- [53] Zielinski, M., Kahl, S., Standfuß-Gabisch, C., Cámara, B., Seeger, M. and Hofer, B. (2006). Generation of novel-substrate-accepting biphenyl dioxygenases through segmental random mutagenesis and identification of residues involved in enzyme specificity. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2191-2199.
- [54] (2003) Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols (Arnold, F.H. and Georgiou, G., Hrsg.), Humana Press, Totowa, New Jersey.
- [55] Lutz, S. and Patrick, W.M. (2004). Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 291-297.
- [56] Neylon, C. (2004). Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Research* 32, 1448-1459.
- [57] Jensen, M.H., Mirza, O., Albenne, C., Remaud-Siméon, M., Monsan, P., Gajhede, M. and Skov, L.K. (2004). Crystal structure of the covalent intermediate of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. *Biochemistry* 43, 3104-3110.
- [58] Rosenow, E.C. (1919). Studies on elective localization. *Journal of Dental Research* 1, 205-249.
- [59] Hayden, R.L. (1923). Elective localization in the eye of bacteria from infected teeth. *Archives of Internal Medicine* 32, 828-849.
- [60] Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual (*Third Edition*). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [61] Zimmer, R. and Gibbins, A.M.V. (1997). Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 42, 217-226.
- [62] Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.
- [63] Beine, R. (2004). Kinetik von Dextranucrasen mit neuen Substraten. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- [64] Bounias, M. (1980). N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride as a new reagent for nanomole quantification of sugars on thin-layer plates by a mathematical calibration process. *Analytical Biochemistry* 106, 291-295.
- [65] Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W.W., Short, J.M., Sorge, J.A. and Mathur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108, 1-6.

- [66] Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R.K. (1988). A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research* 16, 7351-7367.
- [67] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- [68] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- [69] Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1605-1612.
- [70] Swistowska, A.M., Wittrock, S., Collisi, W. and Hofer, B. (2008). Heterologous hyper-expression of a glucansucrase-type glycosyltransferase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 255-261.
- [71] Sørensen, H.P. and Mortensen, K.K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115, 113-128.
- [72] Kido, M., Yamanaka, K., Mitani, T., Niki, H., Ogura, T. and Hiraga, S. (1996). RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 178, 3917-3925.
- [73] Lopez, P.J., Marchand, I., Joyce, S.A. and Dreyfus, M. (1999). The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. *Molecular Microbiology* 33, 188-199.
- [74] Mayer, R.M. (1987). Dextranucrase: a glucosyltransferase from *Streptococcus sanguis*. *Methods in Enzymology* 138, 649-661.
- [75] van der Veen, B.A., Potocki-Véronèse, G., Albenne, C., Joucla, G., Monsan, P. and Remaud-Siméon, M. (2004). Combinatorial engineering to enhance amylosucrase performance: construction, selection, and screening of variant libraries for increased activity. *FEBS Letters* 560, 91-97.
- [76] Sugimoto, K., Nishimura, T., Nomura, K., Sugimoto, K. and Kuriki, T. (2003). Syntheses of arbutin- α -glycosides and a comparison of their inhibitory effects with those of α -arbutin and arbutin on human tyrosinase. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 51, 798-801.
- [77] Moon, Y.H., Nam, S.H., Kang, J., Kim, Y.M., Lee, J.H., Kang, H.K., Breton, V., Jun, W.J., Park, K.D., Kimura, A. Kim, D. (2007). Enzymatic synthesis and characterization of arbutin glucosides using glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 559-567.

- [78] Seo, D.-H., Jung, J.H., Ha, S.J., Song, M.C., Cha, J., Yoo, S.H., Kim T.J., Baek, N.I., Park, C.S. (2009). Highly selective biotransformation of arbutin to arbutin- α -glucoside using amylosucrase from *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 60, 113-118.
- [79] Hénaut, A. and Danchin, A. (1996). Analysis and predictions from *Escherichia coli* sequences, or *E. coli in silico*. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology (Second Edition)*, 2047-2066. (Neidhardt, F., Hrsg.). American Society for Microbiology Press, Washington DC
- [80] Davies, G.J., Wilson, K.S. and Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal* 321, 557-559.
- [81] Morley, K.L. and Kazlauskas, R.J. (2005). Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends in Biotechnology* 23, 231-237.
- [82] Sarçabal, P., Remaud-Siméon, M., Willemot, R., Potocki de Montalk, G., Svensson, B. and Monsan, P. (2000). Identification of key amino acid residues in *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *FEBS Letters* 474, 33-37.
- [83] Baker, D. and Sali, A. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294, 93-96.
- [84] Sali, A. and Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology* 234, 779-815.
- [85] Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 411-421.
- [86] Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 60, 512-538.
- [87] Baneyx, F. and Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 22, 1399-1407.
- [88] Okada, G. and Hehre, E.J. (1973). *De novo* synthesis of glycosidic linkages by glycosylases: utilization of α -D-glucopyranosyl fluoride by amylosucrase. *Carbohydrate Research* 26, 240-243.
- [89] Tao, B.Y., Reilly, P.J. and Robyt, J.F. (1988). *Neisseria perflava* amylosucrase: Characterization of its product polysaccharide and a study of its inhibition by sucrose derivatives. *Carbohydrate Research* 181, 163-174.
- [90] Feingold, D.S., Avigad, G. and Hestrin, S. (1957). Enzymatic synthesis and reactions of sucrose isomer (α -D-galactopyranosyl- β -D-fructofuranoside). *Journal of Biological Chemistry* 224, 295-307.
- [91] Avigad, G., Feingold, D.S. and Hestrin, S. (1956). An enzymic synthesis of a sucrose analog: α -D-xylopyranosyl- β -D-fructofuranoside. *Biochimica et Biophysica Acta* 20, 129-134.

- [92] Tanriseven, A. and Robyt, J.F. (1989). Synthesis of 4,6-dideoxysucrose, and inhibition studies of *Leuconostoc* and *Streptococcus* D-glucansucrases with deoxy and chloro derivatives of sucrose modified at carbon atoms 3, 4, and 6. Carbohydrate Research 186, 87-94.
- [93] Nisizawa, T., Takeuchi, K., Imai, S., Kitahata, S. and Okada, S. (1986). Difference in mode of inhibition between α -D-xylosyl β -D-fructoside and α -isomaltosyl β -D-fructoside in synthesis of glucan by *Streptococcus mutans* D-glucosyltransferase. Carbohydrate Research 147, 135-144.
- [94] Binder, T.P. and Robyt, J.F. (1985). Inhibition of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases by sucrose analogs modified at positions 6 and 6'. Carbohydrate Research 140, 9-20.
- [95] Binder, T.P. and Robyt, J.F. (1986). Inhibition- and acceptor-reaction studies of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases with 3-deoxysucrose, 3-deoxy-3-fluorosucrose, and α -D-allopyranosyl β -D-fructofuranoside. Carbohydrate Research 154, 229-238.
- [96] Sugimoto, K., Nomura, K., Nishimura, T., Kiso, T., Sugimoto, K. and Kuriki, T. (2005). Syntheses of α -arbutin- α -glycosides and their inhibitory effects on human tyrosinase. Journal of Bioscience and Bioengineering 99, 272-276.
- [97] Albenne, C., Potocki De Montalk, G., Monsan, P., Skov, L., Mirza, O., Gajhede, M. and Remaud-Siméon, M. (2002). Site-directed mutagenesis of key amino acids in the active site of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. Biologia - Section Cellular and Molecular Biology 57, 119-128.
- [98] Dunbrack Jr, R.L. (2002). Rotamer libraries in the 21st century. Current Opinion in Structural Biology 12, 431-440.
- [99] Devulapalle, K.S., Goodman, S.D., Gao, Q., Hemsley, A. and Mooser, G. (1997). Knowledge-based model of a glucosyltransferase from the oral bacterial group of mutans streptococci. Protein Science 6, 2489-2493.
- [100] Hellmuth, H., Wittrock, S., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Hofer, B., Seibel, J., (2008). Engineering the glucansucrase GTFR enzyme reaction and glycosidic bond specificity: toward tailor-made polymer and oligosaccharide products. Biochemistry 47, 6678-6684.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Leuten bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt selbstverständlich Dr. Bernd Hofer. Vielen Dank dafür, dass ich die Doktorarbeit mit diesem interessanten Thema machen durfte, für die Betreuung während der Arbeit, für die vielen guten Ratschläge auch über meine Doktorarbeit hinaus und nicht zuletzt auch für die kritischen und nicht selten langen Diskussionen.

Weiterhin finde ich es schön zu wissen, dass die Ergebnisse meiner Arbeit für weitere Forschungen genutzt wurden und werden.

Bei Herrn Prof. Dietmar Pieper bedanke ich mich dafür, dass er sich freundlicherweise bereit erklärt hat, für den verstorbenen Herrn Prof. Jürgen Wehland als Mentor meiner Arbeit einzuspringen.

Gleichermaßen gilt mein Dank Herrn Prof. a. D. Klaus Buchholz für die Übernahme des Koreferats sowie Herrn Prof. Siegmund Lang für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Dr. Howard Junca und dem leider ebenfalls schon verstorbenen Dr. Hans-Jürgen Hecht danke ich für die Teilnahme an meinem Thesis-Komitee. Dr. Ronald Frank hat freundlicherweise die Nachfolge von Dr. Hecht übernommen.

Weiterhin danke ich Dr. Hecht für die *in-silico*-Analysen, die tollen Einblicke in die Struktur der Amylosucrase und die vielen fruchtbaren Vorschläge für meine Arbeit. Dr. Birgit Hofmann danke ich für die Modellierung der Varianten.

Bei Rafael Beine, Hendrik Hellmuth und allen beteiligten Mitarbeitern am Institut für Technische Chemie der TU Braunschweig bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung der Saccharose-Analoga und die gute Zusammenarbeit im Teilprojekt A3 des SFB 578.

Dr. Heinrich Steinmetz gilt mein Dank für die Analyse von Proben per LC-MS.

Selbstverständlich danke ich besonders Iris Plumeier, Christine Standfuß-Gabisch, Silke Kahl, Sabine Wittrock, Wera Collisi, Anja Swistowska, Beatriz Cámara, Hamdy Ali, Ba Huu Nguyen und Howard Junca und allen weiteren nicht namentlich genannten Mitarbeitern der damaligen AG Biodegradation von Prof. Dr. Dietmar Pieper für die herzliche Aufnahme, die Unterstützung und das tolle Arbeitsklima. Ich hätte mir kein schöneres und freundschaftlicheres Umfeld für meine Arbeit vorstellen können.

Ebenso möchte ich mich natürlich bei Dr. Ronald Frank und allen Mitarbeitern der AG Chemische Biologie für die freundliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe nach unserem Umzug bedanken.

Ich danke Dir, Frauke, für Deinen Langmut und für Deinen unermüdlichen Antrieb, diese Arbeit zu vollenden.